

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2002 年 6 月 27 日 (27.06.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/50307 A1(51) 国際特許分類: C12Q 1/68, C12N 15/09,  
G01N 33/53, 27/62, 33/566, C12M 1/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/10892

(22) 国際出願日: 2001 年 12 月 12 日 (12.12.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2000-378091  
2000 年 12 月 12 日 (12.12.2000) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中  
外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI  
KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目  
5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 猪子 英俊  
(INOKO, Hidetoshi) [JP/JP]; 〒243-0034 神奈川県厚木  
市船子1583-1-101 Kanagawa (JP). 田宮 元 (TAMIYA,  
Gen) [JP/JP]; 〒259-1143 神奈川県伊勢原市下糟屋2235-2-102 Kanagawa (JP). 中島憲史 (NAKAJIMA,  
Kenji) [JP/JP]; 〒259-1138 神奈川県伊勢原市神戸  
616-3-207 Kanagawa (JP). 木村直紀 (KIMURA, Naoki)  
[JP/JP]; 〒266-0015 千葉県千葉市緑区小金沢町  
66-1-203 Chiba (JP). 永島廉平 (NAGASHIMA, Renpei)  
[JP/JP]. 森川 寛 (MORIKAWA, Minoru) [JP/JP]; 〒  
104-8301 東京都中央区京橋2-1-9 中外製薬株式会  
社内 Tokyo (JP). 岡本浩一 (OKAMOTO, Kouichi)  
[JP/JP]; 〒259-1132 神奈川県伊勢原市桜台1-21-3-301  
Kanagawa (JP).(74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒  
300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階  
Ibaraki (JP).(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,  
OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF DETECTING POLYMORPHISM IN DNA BY USING MASS SPECTROSCOPY

(54) 発明の名称: 質量分析を利用してDNAの多型を検出する方法

(57) Abstract: In detecting a genetic polymorphism by using a mass spectroscopic instrument, a genomic DNA containing the target polymorphism can be selected from a DNA sample on a substrate and bonded to the substrate by bonding an oligonucleotide hybridizable with the genomic DNA containing the target polymorphism to the substrate and then applying the genomic DNA sample to the substrate. Thus, it is found out that a target polymorphism can be more efficiently detected thereby. According to this method, polymorphisms in a large number of specimens can be quickly and comprehensively detected.

(57) 要約:

質量分析器を利用した遺伝多型の検出において、目的の多型を含むゲノムDNAとハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチドを基板結合させ、この基板にゲノムDNA試料を適用することにより、基板上で該DNA試料から目的の多型を含むゲノムDNAを選別すると共に基板に結合させることができ、これにより効率的に標的多型を検出し得ることを見出した。本発明の方法によれば、多くの検体の多型の検出を迅速かつ網羅的に行うことができる。

WO 02/50307 A1



許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:  
国際調査報告書

- 1 -

## 明細書

## 質量分析を利用してDNAの多型を検出する方法

技術分野

本発明は、質量分析を利用してゲノム上の多型を効率的に同定するためのシステムに関する。

背景技術

ゲノム解析技術の発展に伴い、現在では、ヒト全ゲノム塩基配列が決定されつつある。さらに、決定されたゲノム塩基配列情報を利用して、個々人のゲノム塩基配列の差異、即ち、遺伝多型の決定も盛んに行なわれるようになってきた。遺伝多型の決定は、疾患関連遺伝子、疾患原因遺伝子、ひいては創薬標的遺伝子の特定を可能とするため、近年、医療・診断分野における最も重要な課題の一つとなっている。

これまで遺伝多型を決定する手法としては、例えば、PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法が用いられてきた。この方法は、PCRにて増幅した産物に塩基配列特異的な制限酵素を反応させた後、電気泳動にて塩基配列の違いによる切断の有無を分子量の違いとして検出することを原理とする。しかしながら、この方法においては、多型部位を特異的に認識する制限酵素が必ずしも存在するとは限らず、また、対象とするSNPsにより用いる制限酵素が異なるため、大量のサンプルを扱うにはあまり適していないという問題点が存在する。

また、PCR-SSPC (Single-Strand Conformation Polymorphism) 法も遺伝多型の検出に利用されてきた。1本鎖に変性させたDNAを非変性条件に戻すと、ヘアピンループなどの分子高次構造を形成し、この分子内構造は1塩基の変異によっても大きく影響を受け大きく変化する。この方法は、この構造の違いを非変性条件のポ

- 2 -

リアクリルアミドゲル電気泳動で移動度の違いとして検出することを原理とする。しかしながら、この方法においては、その変異のすべてを検出することは困難であり、多型の取りこぼしは避けられず、また、電気泳動時の条件により移動度が変化し、再現性のあるデータを得ることは容易ではないなどの問題点が存在する。

また、自動蛍光シーケンサーを用いた遺伝多型の解析も行なわれてきた。この方法においては、まず、多型マイクロサテライト繰り返し配列を挟んでプライマーを設定し、さらにそのプライマーに蛍光修飾を行なう。次いで、このプライマーを用いてPCRを行ない、得られた産物を自動蛍光シーケンサーにて泳動し、その鎖長を標準DNAを指標として計測することにより、繰り返し配列の多型を検出する。この方法は、近年、大量のサンプルを処理可能なシーケンサーが開発されて汎用されるに至り、マイクロサテライト多型を検出する有効な手段となっている。しかしながら、この方法では、サンプルの正確な鎖長を特定することは不可能であり、マイクロサテライト繰り返し単位が1塩基、2塩基のものでは多型判定が困難である場合があるなどの問題点が存在する。

一方、質量分析を利用した多型の検出も行なわれるようになった。これまで質量分析は、多数のサンプルが迅速に解析できない、検出されるDNAの分子量の大きさに検出限界があると考えられていたなどの理由により、多型の検出に利用されておらず、主として合成オリゴヌクレオチドの純度検定のために利用されてきた。質量分析を利用した純度検定においては、検体である合成オリゴヌクレオチドをステンレス基板または同等の伝導性を保持する基板に直接マトリックス溶液と共に塗布し乾燥させた上で、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; MALDI-TOF MS) によりピークを検出していた。

最近になり、ようやく質量分析器を利用した、一塩基置換多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) の検出も行なわれるようになった。この方法は、検出したいゲノムフラグメントをsilicone dioxide derivatization reactionにより

- 3 -

基板に固定化した上で、Primer-Oligo Based Extentionプライマーによりポリメラーゼ連鎖反応を行い、反応物を質量分析器を用いて検出し、一塩基置換多型を決定するものである (Kai Tang et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol.96, p.p.10016-10020, (1999))。

しかしながら、質量分析器を利用した従来の遺伝多型の検出法では、検出したい多型を有するDNA試料を調製した上で、これを直接基板に塗布させ、分子量の測定を行なうため、これら手法を利用して多くの検体の測定を行なう場合には、多大の時間と労力を必要となるという問題が存在した。

#### 発明の開示

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は質量分析器を利用して遺伝多型を効率的に検出し得る方法を提供することにある。本発明は、また、多量の検体の遺伝多型を迅速かつ網羅的に検出する方法を提供することを目的とする。

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った。その結果、質量分析器を利用した遺伝多型の検出において、目的の多型を含むゲノムDNAとハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを基板に結合させ、この基板にゲノムDNA試料を適用することにより、基板上で該DNA試料から目的の多型を含むゲノムDNAを選別すると共に基板に補足することができ、これにより効率的に標的多型を検出し得ることを見出した。

即ち、従来法においては、予め目的の多型を含むゲノムDNAを選別した上で、これを直接基板に塗布してその多型を検出していたため、多型の検出に多大な時間と労力を必要とした。一方、本発明の方法によれば、基板に目的の多型を含むゲノムDNAとハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを結合させているため、DNA試料中に目的の多型を含むゲノムDNA以外のDNAが含まれていても、ハイブリダイゼーション反応により、基板上で目的のDNAを選別でき、それと同時に基板に該DN

- 4 -

Aを補足することができる。このため、本発明の方法においては、予め多型を含むゲノムDNAを選別して基盤に塗布する必要がなく、多型の検出を効率的に行うことが可能である。このことは特に多くの検体の多型の検出を行う場合、例えば、数100人—数1,000人のサンプル集団について遺伝多型のバリエーションを網羅的に決める場合やある疾患群の疾患相関解析に必要な遺伝マーカー（例えば多型マイクロサテライト）を同定する場合などにおいて有効である。

本発明は、上記知見を基に完成されたものであり、質量分析を利用したDNAの多型の検出において、基板上でのハイブリダイゼーション反応を利用して目的の多型を含むDNAの選別および補足を行なう方法を提供する。

より詳しくは、本発明は、

- (1) DNAの多型を検出する方法であって、
  - (a) 被験者から多型部位とその近傍領域を含むDNA試料を調製する工程、
  - (b) 基板に固定したオリゴヌクレオチドフラグメントであって標的多型を含むDNAと特異的にハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドフラグメントに対し、上記DNA試料をハイブリダイズさせる工程、および
  - (c) 基板に固定したオリゴヌクレオチドフラグメントにハイブリダイズされたDNAを質量分析により検出する工程、を含む方法、
- (2) 基板に固定したオリゴヌクレオチドフラグメントが、検出する多型の近傍領域の塩基配列と特異的にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を有している、(1)に記載の方法、
- (3) 工程(a)におけるDNA試料が、(i) 多型部位を挟みこむように設計されたプライマー対であって、少なくともその一方が特異的に切断することが可能な部位を含むプライマー対を利用して、被験者由来のゲノムDNAを鋳型にポリメラーゼ連鎖反応を行ない、(ii) これにより得られる増幅産物を、該特異的に切断することが可能な部位で切断し、(iii) 切断後の該増幅産物に対し、任意のDNAを付加する、ことにより得られるものであり、工程(b)におけるオリゴヌクレ



- 5 -

オチドが、該任意のDNAに特異的にハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドである、(1)に記載の方法、

(4) 特異的に切断することが可能な部位が制限酵素部位である、(3)に記載の方法、

(5) 多型がマイクロサテライトである、(1)から(4)のいずれかに記載の方法、

(6) 多型部位とその近傍領域を含むDNA試料が、同一人の複数の異なる遺伝子座の多型部位を標的として調製されており、該DNA試料を、同一の基板上に固定されたオリゴヌクレオチドに同時にハイブリダイズさせる、(1)から(5)のいずれかに記載の方法、

(7) 多型部位とその近傍領域を含むDNA試料が、複数人の同一の遺伝子座の多型部位を標的として調製されており、該DNA試料を、同一の基板上に固定されたオリゴヌクレオチドに同時にハイブリダイズさせる、(1)から(5)のいずれかに記載の方法、

(8) (3)に記載の方法に用いるための基板であって、該任意のDNAに特異的にハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドが固定された基板、

(9) (6)に記載の方法に用いるための基板であって、同一人の複数の異なる遺伝子座の多型部位を標的として調製された、多型部位とその近傍領域を含むDNA試料に対し、ハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドフラグメントが固定された基板、

(10) (7)に記載の方法に用いるための基板であって、複数人の同一の遺伝子座の多型部位を標的として調製された、多型部位とその近傍領域を含むDNA試料に対し、ハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドフラグメントが固定された基板、

(11) オリゴヌクレオチドフラグメントが、多型の近傍領域の配列と特異的にハイブリダイズすることが可能な配列を有している、(9)または(10)に

記載の基板、

(12) 多型がマイクロサテライトである、(8) から (11) のいずれかに記載の基板、および

(13) 基板がガラス板である、(8) から (12) のいずれかに記載の基板、を提供するものである。

本発明は、質量分析器を利用してDNAの多型を効率的に検出する方法を提供する。本発明の方法においては、まず、被験者から多型部位とその近傍領域を含むDNA試料を調製する(工程(a))。

本発明の方法において検出し得る多型としては特に制限はない。多型としては、例えば、一塩基置換多型(SNP)やマイクロサテライトなどが挙げられるが、広大なゲノム領域を標的とした相関解析においては、特にマイクロサテライトが好適である。マイクロサテライトを利用してヒトの全ゲノム領域をカバーする相関解析を行なう場合には、約3万箇所のマイクロサテライトを利用することができれば目的を達成し得るが、一塩基置換多型の場合には、約数10万箇所が必要であると考えられる。従って、本発明の方法を利用して広大なゲノム領域を標的とした相関解析を行なう場合には、マイクロサテライトを標的とする方が、検出対象として必要となる多型の数の減少を図ることができるため好適である。

多型部位とその近傍領域を含むDNA試料は、例えば、以下のようにして被験者から調製することができる。即ち、まず、ヒトゲノム配列からマイクロサテライト繰り返し配列をコンピューターにより検出し、その繰り返し配列を挟んで単位複製配列(amplicon)の鎖長が200bpから300bpとなるようにプライマーを設定する。次いで、このように設定したプライマーを用いて被験者のゲノムDNAを鋳型にPCRを行なうことにより、目的サイズのDNA試料を得る。

本発明において多型部位の「近傍領域」とは、ゲノムDNA上で多型部位と隣接する該多型の5'側および3'側のDNA領域を指す。質量分析器を利用して分析可能なDNA断片のサイズは、一般に200bpから300bpである。従って、本発明においてプライ

- 7 -

マーを設定して遺伝子増幅を行なう対象とする「多型部位の近傍領域」は、通常、多型部位から300bp以内であり、好ましくは200bp以内である。

本発明の方法においては、次いで、基板に固定したオリゴヌクレオチドフラグメントであって、標的多型を含むDNAと特異的にハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドフラグメントに対し、上記DNA試料をハイブリダイズさせる（工程(b)）。

この工程においては、目的的多型を含むDNAが、DNA試料から選別されると同時に基板に補足される。このため目的的多型を含むDNAを予め調製して塗布していた従来法と比較して、格段に労力と時間が削減される。このことは特に多量の検体の多型を検出する場合に顕著である。例えば、複数の多型を標的とする複数のオリゴヌクレオチドがそれぞれ異なるドットとして結合された基板に対し、それぞれの多型を含むDNAの混合物からなるDNA試料を適用した場合においても、本発明によれば、基板上でそれぞれのオリゴヌクレオチドに対応するDNAが振り分けられる。従って、ハイブリダイズする位置により、該DNAがどの多型に対応するかを区別することができる。これにより多量の検体の多型を迅速かつ網羅的に検出することが可能となる。

本発明の方法において「基板」とは、オリゴヌクレオチドを固定することが可能な材料であれば特に制限されないが、好ましくは板状の材料である。オリゴヌクレオチドを結合させる基板としては、検出対象となるDNAをイオン化させるため電導性を有するものを用いる。基板としては電導性を有するものであれば特に制限はないが、例えば、電導性の板に固定したガラス板を本発明において好適に用いることができる。好ましい伝導性の板としては、例えば、ステンレス板を例示することができる。ガラス板はポリカルボジイミド等によりコートされているガラス板であることが好ましい。

基板に固定するオリゴヌクレオチドは、標的多型を含むDNAと特異的にハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドフラグメントであれば特に制限はない。ここで「特異的にハイブリダイズ」とは、DNA試料中の標的多型を含むDNAと

- 8 -

実質的にハイブリダイズし、他のDNAとは実質的にハイブリダイズしないことを意味する。オリゴヌクレオチドは、好ましくは検出する多型の近傍領域の塩基配列と特異的にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を有する。特異的なハイブリダイズが可能であれば、検出する多型の近傍領域の塩基配列に対し、完全に相補的である必要はない。

基板に固定するオリゴヌクレオチドは1種類に限定する必要はなく、同定したいゲノムフラグメントの領域で相補性を有する複数種のオリゴヌクレオチドの混合物でもよい。本発明の好ましい態様において、基板に固定するオリゴヌクレオチドは、同一人からの遺伝情報を得るように設計することができる。例えば、同一人のマイクロサテライトの多型を同定できるように、多くの多型部位（例えば、10,000－30,000部位）を標的としたオリゴヌクレオチドを1枚もしくは複数枚の基板上に固定して1セットとして用いることができる。このような同一基板上の複数種のオリゴヌクレオチドに対し、被験者から調製したDNA試料を同時に適用し、ハイブリダイズさせることにより、同一人の複数の多型を迅速かつ網羅的に検出することが可能となる。従って、基板上に、例えば、複数の疾患に関係する複数の多型を標的としたオリゴヌクレオチドを結合しておけば、被験者が発病するおそれのある、あるいは発病している疾患を簡便に同定することができるため、このような基板は遺伝子診断において特に有用である。

また、本発明の他の好ましい態様において、基板に同一のオリゴヌクレオチドを複数のドットとして結合させることにより、特定の多型に関する複数人のサンプル集団の遺伝情報を迅速かつ網羅的に得ることができる。このような態様は、特に、遺伝多型（例えば、マイクロサテライトやSNP）を利用して疾患相関解析を行なう上で有効である。

被験者からDNA試料を調製する際に、多型およびその近傍領域を含むDNAの末端に任意のDNAを付加した場合には、該任意のDNAに特異的にハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドが固定された基板を利用して目的のDNAの多型を検

出することも可能である。この場合、DNA試料は、(I) 多型部位を挟みこむように設計されたプライマー対であって、少なくともその一方が特異的に切断することが可能な部位を含むプライマー対を利用して、被験者由来のゲノムDNAを鋳型にポリメラーゼ連鎖反応を行ない、(ii) これにより得られる増幅産物を、該特異的に切断することが可能な部位で切断し、(iii) 切断後の該増幅産物に対し、任意のDNAを付加する、ことにより得ることができる。DNA試料における特異的に切断することが可能な部位は、好ましくは制限酵素部位である。制限酵素部位としては、ゲノム上で頻度の低いもの、例えば、NotI部位などが好ましい。切断処理後の増幅産物に付加する任意のDNAとしては、特に制限はないが、例えば、polyA配列を好適に用いることができる。

基板に結合するオリゴヌクレオチドの長さは、一般的には、5塩基から200塩基であり、好ましくは10塩基から130塩基であり、さらに好ましくは15塩基から100塩基である。オリゴヌクレオチドの基板への固定は、化学的または非化学的に行なうことができる。化学的な固定の手法としてはカルボジイミド法（特開2000-146978号）を例示することができ、非科学的な固定の手法としてはポリリジン法（P. O. Brown's Lab.: <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/>）を例示することができる。

基板上のオリゴヌクレオチドとDNA試料とのハイブリダイゼーション反応は、例えば、実施例記載の条件により行なうことができる。但し、ハイブリダイゼーション条件は、オリゴヌクレオチドの長さなどの諸要因により変動し得ることは当業者に周知であることを理解されたい。

本発明の方法においては、次いで、基板に固定したオリゴヌクレオチドフラグメントにハイブリダイズされたDNAを質量分析により検出する（工程(c)）。

質量分析の方法としては、絶対分子量が得られる方法であれば特に制限はないが、例えば、MALDI-TOF MSが好ましい。MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization (マトリックス支援レーザー脱離イオン化法)) における試料は、多量のマトリックスと均一に混合された状態におかれる。マトリックスは、紫外

- 10 -

光である窒素レーザー光（波長=337 nm）を吸収し、熱エネルギーに変換する。この時、マトリックスのごく一部が急速に加熱され、試料と共に気化される。また、TOF MS（Time of Flight Mass Spectrometry（飛行時間型質量分析法））は、イオンの電荷量を $z$ 、イオンの質量を $m$ とした時に質量電荷比 $m/z$ 値の違いでイオンの飛行時間が異なることを利用して質量分析を行う。MALDI-TOF MSは、GPCやLALLSなどの相対分子量を求める他の質量分析法と異なり、絶対分子量が得られるという特徴を持つ。

MALDI-TOF MSで検出するためのDNA試料は、事前処理として、非化学的結合による二重鎖を高温（例えば、90℃）処理および急冷処理を必ずしもする必要はない。しかしながら、これらの事前処理は検体感度を高め得るために好ましい。質量分析を行なう際には、DNAがハイブリダイズした基板に対し適当なマトリックス溶液を加え、基板上のDNAを乾固する。

質量分析においては、イオン化された検体（基板上のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたDNA）の分子量に応じて、その飛行時間が異なり、この異なる飛行時間が異なるピーク位置として検出される。分子量が大きいほど飛行時間は短くなり、逆に分子量が小さいほど飛行時間は長くなる。従って、検出されたピーク位置により、検体の分子量を判定することができ、これにより検体の多型（マイクロサテライトの繰り返し数や一塩基置換多型における塩基の種類）を特定することができる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、ガラス板を用いた200 bp dsDNA(PCR産物)MALDI-TOFMS測定の結果を示す図である。

図2は、ステンレス板を基板として配列番号：1のオリゴヌクレオチドを固定したときのハイブリダイゼーションシグナルを示す図である。

図3は、ステンレス板を基板として配列番号：2のオリゴヌクレオチドを固定

- 1 1 -

したときのハイブリダイゼーションシグナルを示す図である。

図4は、ステンレス版であるサンプルスライドへのカバーガラスの固定を示す図である。

図5は、ガラス板を基板として配列番号：4または5（陰性対照）のオリゴヌクレオチドを固定したときのハイブリダイゼーションシグナルを示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例1] ガラス板を用いた200bp dsDNA(PCR産物)MALDI-TOFMS測定

##### (1) PCR反応

PCRに用いた反応混合液(x1)は以下の通りである（()内はx100の場合）。

---

鋳型DNA 10ng	1.0 $\mu$ l(100 $\mu$ l)
(pBluescript II SK(+)) plasmid DNA)	
dH <sub>2</sub> O	13.4 $\mu$ l(1340.0 $\mu$ l)
10 $\times$ PCR Reaction バッファー	2.0 $\mu$ l(200.0 $\mu$ l)
(Applied Biosystems)	
dNTP (各2.0mM) (Applied Biosystems)	2.5 $\mu$ l(250.0 $\mu$ l)
ForwardおよびReverseプライマーMix	1.0 $\mu$ l(100.0 $\mu$ l)
(各20 $\mu$ M)	
AmpliTagGold(Applied Biosystems)	0.1 $\mu$ l(10.0 $\mu$ l)
全量	20.0 $\mu$ l(2000.0 $\mu$ l)

---

PCRは、Thermalcycler Cycle PE9700(Applied Biosystems)を用いて、「95℃で9分」の後、「96℃で45秒、60℃で45秒、72℃で1分」を40サイクル、その後「7

- 1 2 -

2°Cで5分、4°Cでの終結」で実施した。

#### (2) MinElute PCR Purification kitによる精製

得られたPCR産物を、QIAGEN MinElute PCR Purification kitプロトコールに従って精製を行った。1本のカラムに対し300 $\mu$ lのPCR産物を通し、dH<sub>2</sub>O 10 $\mu$ lを溶出した。

#### (3) エタノール沈殿

上記QIAGEN精製物 (6セット分(60 $\mu$ l)+dH<sub>2</sub>O 240 $\mu$ l) 300.0 $\mu$ lに、10M Ammonium acetate 46.9 $\mu$ l、100% エタノール 750.0 $\mu$ l、グリコーゲン0.5 $\mu$ lを添加し、エタノール沈殿を行った。-20°Cで20分静置し、12,000rpmで15分遠心し、得られた沈殿を70%エタノールでリンスし、さらに12,000rpmで15分遠心し、10分乾燥を行い、最終的にdH<sub>2</sub>O 15 $\mu$ lにて溶出した。

#### (4) PicoGreen dsDNA Quantitation kitによる定量

PicoGreen dsDNA Quantitation kit(Molecular Probes)プロトコールに従って定量を行った。

#### (5) マトリックスと混合

ステンレス板 (サンプルスライド) にスライドガラス (Code.#000 : 厚さ0.04mm) を両面テープで固定した。

また、50% アセトニトリル 1ml中に、3-Hydroxypridine-2-carboxylic acid(3-Hydroxy-2-picolinic acid): Mw.139.11 0.7Mを0.0974g、Diammonium Hydrogen citrate:Mw.226.2 0.07Mを0.010583gを溶かし、マトリックスを調製した。

マトリックスとサンプルを1 : 1で混合し、ガラス上へ0.5 $\mu$ lスポットした。サンプルスライドは、自然乾燥後 (結晶化)、質量分析器に導入し測定した。

#### (6) MALDI-TOF質量分析

測定は、KRATOS KOMPACT MALDI 4 (島津) を用いて行った。KOMPACT MALDI 4の測定条件を以下に示す。



- 13 -

---

Flight path (イオン飛行経路)	: Linear
Polarity (イオン極性)	: Negative
Mass (イオン加速電圧)	: 20kV
Profiles (1イオンサンプル当たりの測定回数)	: 50
Aim (サンプル全域照射 : 1-1000)	: 1-1000
power (レーザーパワー)	: 140-170(200bp測定時)
Accumulate	: 10
Average	: 1

---

測定の結果、200bpという高分子量のDNA分子について、顕著な高分解能を示すピークが得られた(図1)。このことは、一般的に不適と考えられていた、絶縁体であるガラス板を用いた質量分析が十分に適用可能であることを示している。それと同時に、ガラス板上でハイブリダイズさせたDNAサンプルについて、その状態のままで直接質量分析を行うことが可能であることを示唆するものである。

#### [実施例2] ステンレス板上でハイブリダイゼーションしたDNA分子の質量分析

##### (1) 核酸の固定

ステンレス板(ステンレス板; KRATOS ANALYTICAL(株)社製)を、特開2000-146978の方法に準じてカルボジイミド化した。

配列番号: 1(計算値; 分子量7583)及び配列番号: 2(計算値; 分子量7638)に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを、100pmol/ $\mu$ lになるようにバッファーに溶解しDNA溶液とした。ピペットマンを用いて、カルボジイミド化ステンレス板の所定の位置に、前記DNA溶液を1 $\mu$ lスポットした。

次いで、37°Cにて30分間乾燥を行なった後、3%BSA(ウシ血清アルブミン)を含む緩衝液A(0.2M塩化ナトリウム、0.1Mトリス塩酸(pH7.5)、0.05%トライト

- 14 -

ンX-100) に浸し、37°Cにて15分間乾燥した。次に、このカルボジイミド化ステンレス板をTE緩衝液(10mMトリス塩酸(pH7.2)/1mM EDTA)で洗浄後、37°Cにて15分間乾燥した。

#### (2) ハイブリダイゼーション

上記カルボジイミド化ステンレス板のDNAを固定した部分に、ハイブリダイゼーション溶液[5×SSC(SSC:1.5M NaCl、0.15Mクエン酸ナトリウム)、10%デキストラン、配列番号:3(計算値;分子量6190)のプローブ]25μlをのせ、40°Cのウォーターバスで1晩加熱した。

#### (3) ポストハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションの後、カルボジイミド化ステンレス板からハイブリダイゼーション溶液を軽く吸い取り、ポストハイブリダイゼーション洗浄を行ない、非特異的に吸着したプローブを除去した。

ポストハイブリダイゼーション洗浄条件は、(i) 2×SSC、0.1%SDS;室温5分間、2回、(ii) 0.2×SSC、0.1%SDS;40°C、5分間、2回、(iii) 2×SSC;室温、5分間、(iv) 0.3Mクエン酸アンモニウム水溶液;室温、15秒を採用した。

#### (4) ハイブリダイゼーションの検出

得られたカルボジイミド化ステンレス板をKOMPACT MALDI2((株)島津製作所社製)を用いて測定した。その結果を図2及び図3に示す。

図2及び図3の結果から、本発明の核酸の検出方法によれば、プローブ核酸を(実測値;分子量6185の位置に)非常に明瞭なシグナルとして特異的に得ることができる。一方、配列番号:2のスポットからは、シグナルを検出できなかった。

### [実施例3] カバーガラス上でハイブリダイゼーションしたDNA分子の質量分析

#### (1) 核酸の固定(図4)

カバーガラス#000(松浪ガラス(株)社製)を、特開2000-146978の方法に準じてカルボジイミド化した。

- 15 -

配列番号：4（Captureオリゴマー）及び配列番号：5（陰性対照）に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを、120pmol/ $\mu$ lになるようにバッファーに溶解しDNA溶液とした。ピペットマンを用いて、カルボジイミド化カバーガラスの所定の位置に、前記DNA溶液及びバッファーを0.5 $\mu$ lスポットした。

次いで、固定操作を行なった後、3%BSA（ウシ血清アルブミン）を含む緩衝液A（0.2M塩化ナトリウム、0.1Mトリス塩酸（pH7.5）、0.05%トライトンX-100）に浸し、37°Cにて15分間乾燥した。次に、このカルボジイミド化カバーガラスをTE緩衝液（10mMトリス塩酸（pH7.2）/1mM EDTA）で洗浄後、37°Cにて15分間乾燥した。オリゴヌクレオチド無添加（DNA(-)）も対照として用いた。

## （2）ハイブリダイゼーション

上記カルボジイミド化カバーガラスのDNAを固定した部分に、ハイブリダイゼーション溶液[5×SSC（SSC：1.5M NaCl、0.15Mクエン酸ナトリウム）、10%デキストラン、配列番号：6または配列番号：7のプローブ]10 $\mu$ lをのせ、30°Cの乾燥機で1晩加熱した。

## （3）ポストハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションの後、カルボジイミド化カバーガラスからハイブリダイゼーション溶液を軽く吸い取り、以下の条件でポストハイブリダイゼーション洗浄を行なった。

ポストハイブリダイゼーション洗浄条件は、（I）2×SSC；室温5分間、（ii）0.3Mクエン酸アンモニウム水溶液；室温、15秒を採用した。

## （4）ハイブリダイゼーションの検出

得られたカルボジイミド化ガラス板を「KOMPACT MALDI4（（株）島津製作所社製）」を用いて測定した。質量分析の結果を図5に示す。相補的配列をもつ試料ではピークが観察された。このことからガラス板上でハイブリダイズさせた試料でもMALDI-TOF MSで測定可能であることが判明した。

なお、測定におけるマトリックスは、50% アセトニトリル 1ml中に、3-Hydroxy

- 16 -

pyridine-2-carboxylic acid(3-Hydroxy-2-picolinic acid): Mw.139.11 0.7Mを0.0974g、Diammonium Hydrogen citrate:Mw.226.2 0.07Mを0.010583gを溶かし、調製した。

また、KOMPACT MALDI 4の測定条件を以下に示す。

---

Flight path (イオン飛行経路)	: Linear
Polarity (イオン極性)	: Negative
Mass (イオン加速電圧)	: 20kV
Profiles (1 イオンサンプル当たりの測定回数)	: 50
Aim (サンプル全域照射 : 1-1000)	: 1-1000
Laser power (レーザーパワー)	: 150 (50mer) 、 180 (100mer)
Accumulate	: 10
Average	: 1
Store profile	: never

---

#### 産業上の利用の可能性

本発明により質量分析器を利用して遺伝多型を効率的検出し得る方法が提供され、これにより多検体の遺伝多型を迅速かつ網羅的に検出することが可能となった。本発明の方法は、特定の病気の原因となる多型を決定するための疾患相関解析や遺伝子診断に大きく貢献しうるものである。

## 請求の範囲

1. DNAの多型を検出する方法であって、
  - (a) 被験者から多型部位とその近傍領域を含むDNA試料を調製する工程、
  - (b) 基板に固定したオリゴヌクレオチドフラグメントであって標的多型を含むDNAと特異的にハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドフラグメントに対し、上記DNA試料をハイブリダイズさせる工程、および
  - (c) 基板に固定したオリゴヌクレオチドフラグメントにハイブリダイズされたDNAを質量分析により検出する工程、を含む方法。
2. 基板に固定したオリゴヌクレオチドフラグメントが、検出する多型の近傍領域の塩基配列と特異的にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を有している、請求項1に記載の方法。
3. 工程(a)におけるDNA試料が、(i) 多型部位を挟みこむように設計されたプライマー対であって、少なくともその一方が特異的に切断することが可能な部位を含むプライマー対を利用して、被験者由来のゲノムDNAを鋳型にポリメラーゼ連鎖反応を行ない、(ii) これにより得られる増幅産物を、該特異的に切断することが可能な部位で切断し、(iii) 切断後の該増幅産物に対し、任意のDNAを付加する、ことにより得られるものであり、工程(b)におけるオリゴヌクレオチドが、該任意のDNAに特異的にハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドである、請求項1に記載の方法。
4. 特異的に切断することが可能な部位が制限酵素部位である、請求項3に記載の方法。
5. 多型がマイクロサテライトである、請求項1から4のいずれかに記載の方法。
6. 多型部位とその近傍領域を含むDNA試料が、同一人の複数の異なる遺伝子座の多型部位を標的として調製されており、該DNA試料を、同一の基板上に固定

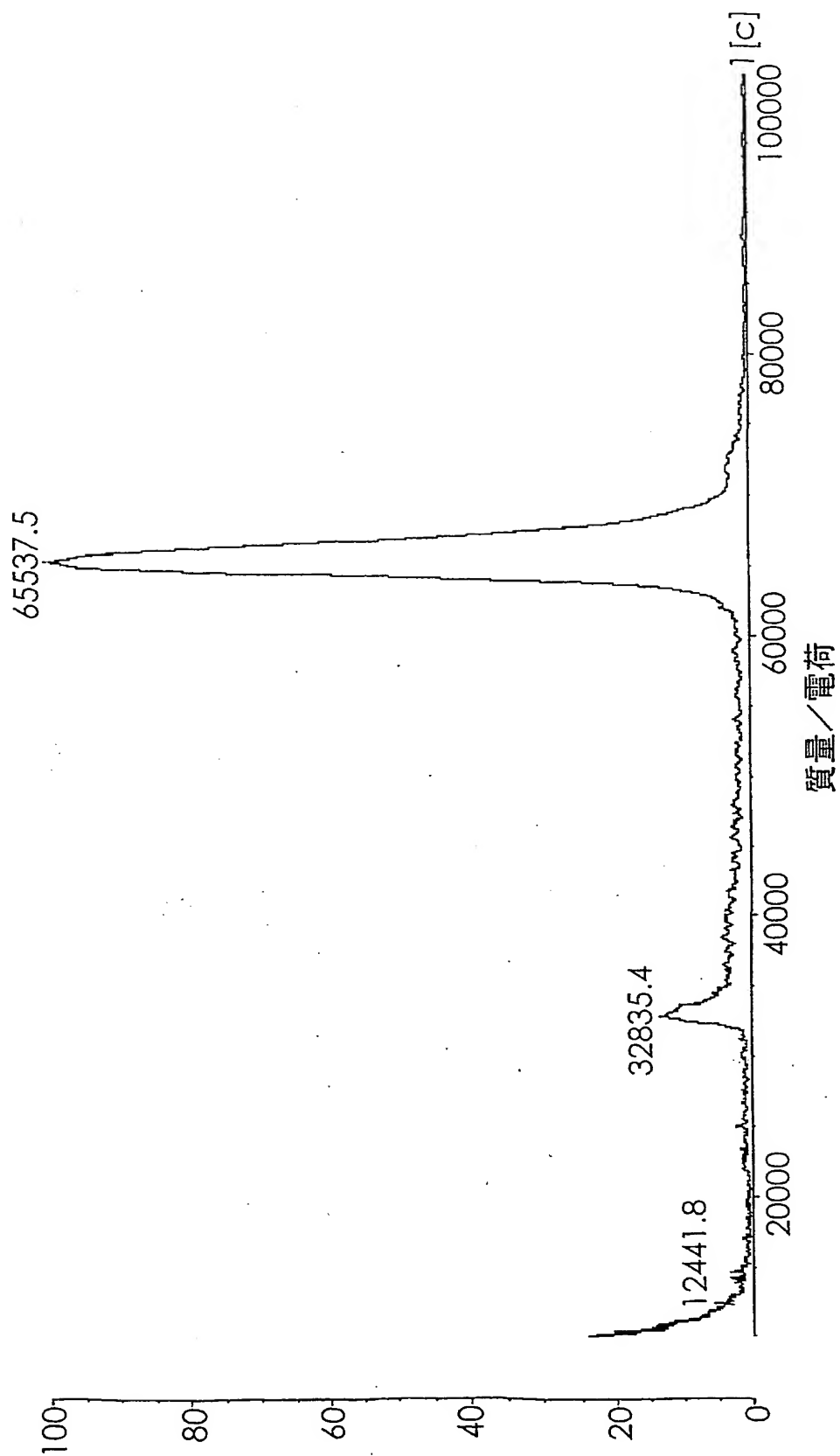
- 18 -

されたオリゴヌクレオチドに同時にハイブリダイズさせる、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

7. 多型部位とその近傍領域を含むDNA試料が、複数人の同一の遺伝子座の多型部位を標的として調製されており、該DNA試料を、同一の基板上に固定されたオリゴヌクレオチドに同時にハイブリダイズさせる、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。
8. 請求項 3 に記載の方法に用いるための基板であって、該任意のDNAに特異的にハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドが固定された基板。
9. 請求項 6 に記載の方法に用いるための基板であって、同一人の複数の異なる遺伝子座の多型部位を標的として調製された、多型部位とその近傍領域を含むDNA試料に対し、ハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドフラグメントが固定された基板。
10. 請求項 7 に記載の方法に用いるための基板であって、複数人の同一の遺伝子座の多型部位を標的として調製された、多型部位とその近傍領域を含むDNA試料に対し、ハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドフラグメントが固定された基板。
11. オリゴヌクレオチドフラグメントが、多型の近傍領域の配列と特異的にハイブリダイズすることが可能な配列を有している、請求項 9 または 10 に記載の基板。
12. 多型がマイクロサテライトである、請求項 8 から 11 のいずれかに記載の基板。
13. 基板がガラス板である、請求項 8 から 12 のいずれかに記載の基板。

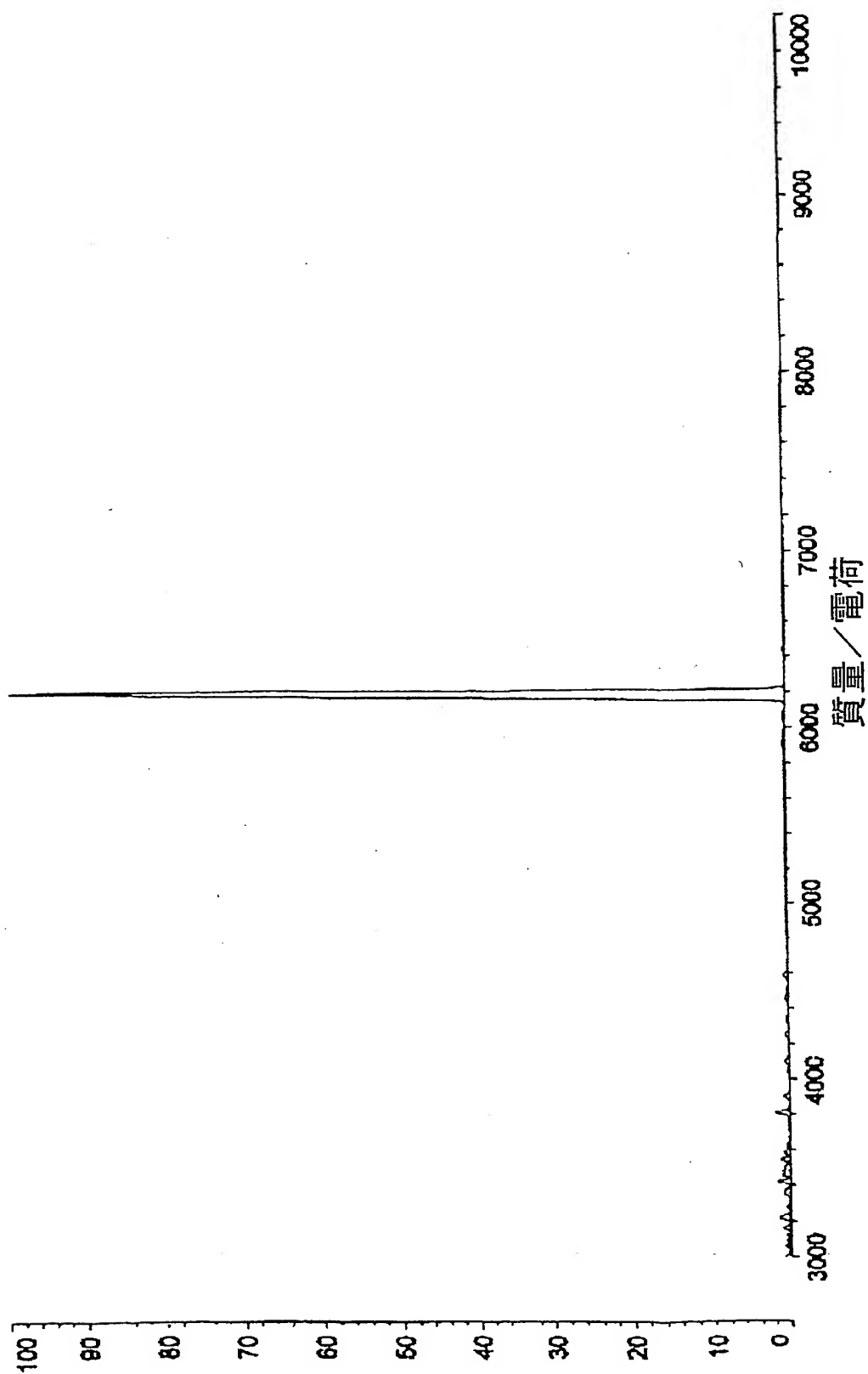
1 / 5

図 1



2 / 5

図 2





3 / 5

図 3

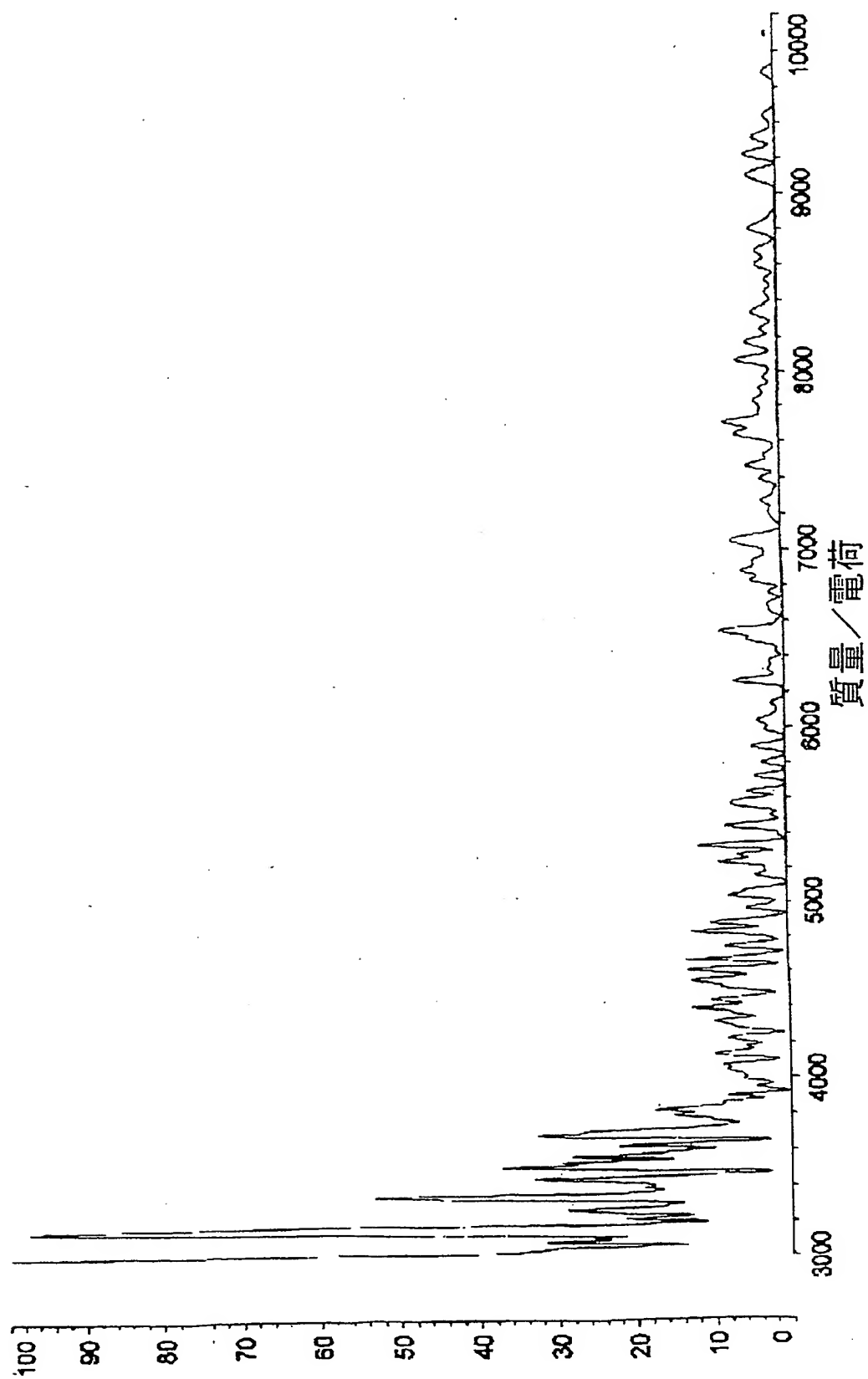


図 4

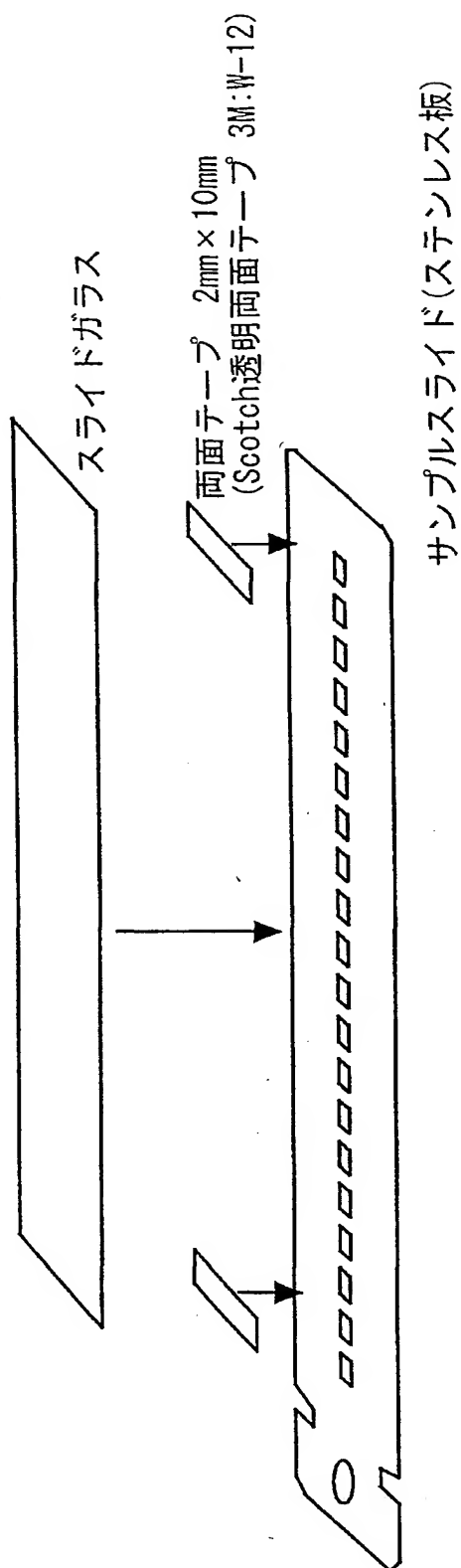
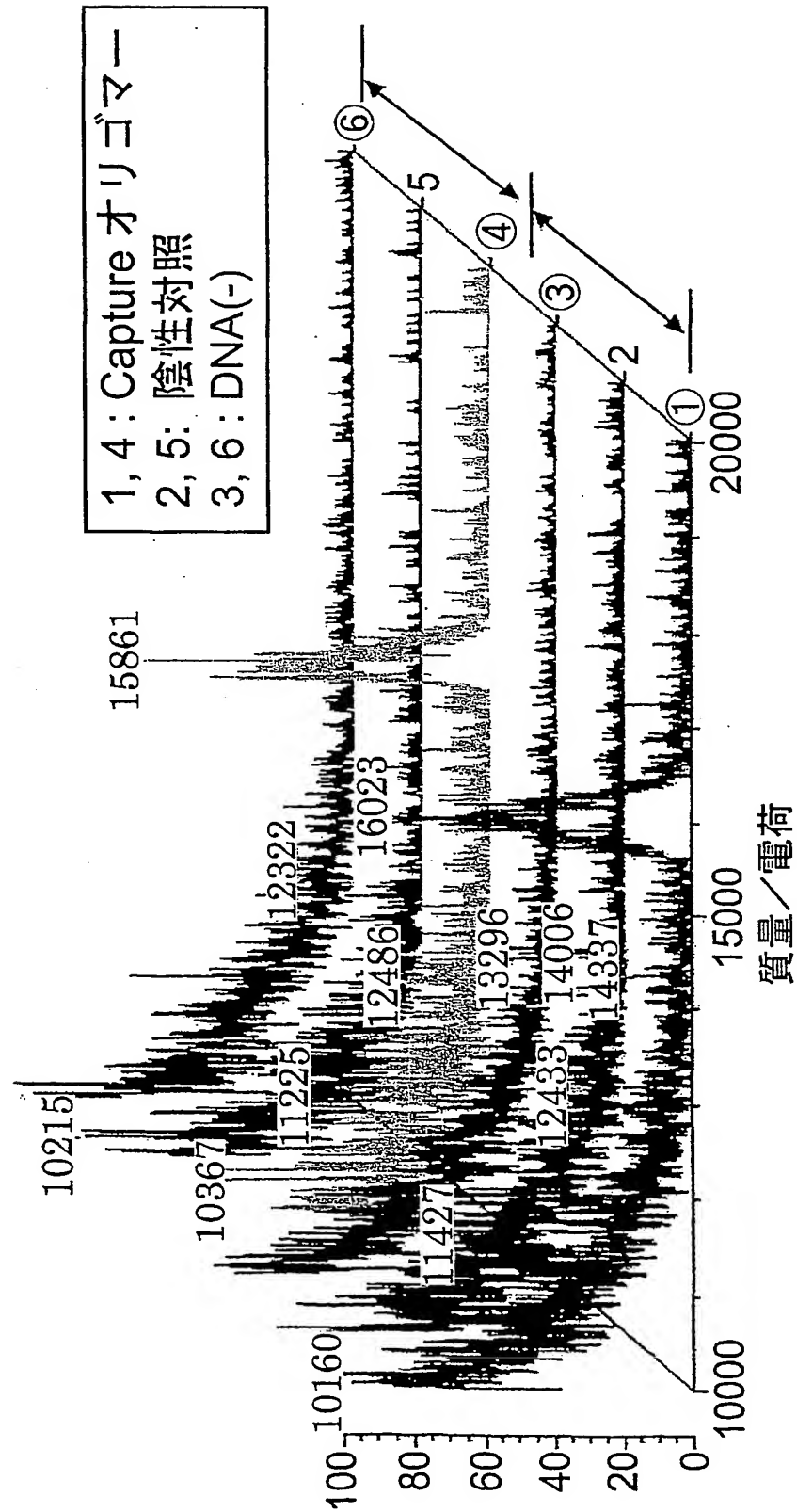


図 5

Kratos Kompact MALDI 4 V5.2.4  
 %Int. 100%= 0 mV 0 mV 0 mV 0 mV 0 mV 0 mV  
 レーザーパワー 150



○ プローブオリゴマー ポリT (50mer) 100pmol

1 / 5

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Method for detection of DNA polymorphisms using MALDI-TOF MS

<130> C1-A0017P

<140>

<141>

<150> JP 2000-378091

<151> 2000-12-12

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized DNA sequence

2 / 5

&lt;400&gt; 1

cctagagatt cctccgtatt agttc

25

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized DNA sequence

&lt;400&gt; 2

tccctgtgga tgtcaagaat ctttt

25

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized DNA sequence

3 / 5

&lt;400&gt; 3

aatacggagg aatctctagg

20

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized DNA sequence

&lt;400&gt; 4

tttttttttt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

40

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized DNA sequence

4 / 5

&lt;400&gt; 5

tttttttttt cctagagatt cctccgtatt agttc

35

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized DNA sequence

&lt;400&gt; 6

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt

50

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized DNA sequence

5 / 5

&lt;400&gt; 7

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 60

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 100



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10892

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/53, G01N27/62, G01N33/566, C12M1/00  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/53, G01N27/62, G01N33/566, C12M1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 96/29431, A (Sequenom Inc.), 26 September, 1996 (26.09.96), & JP 11-508122 A & US 5605798 A & EP 815261 A	1-13
A	EP, 1026259, A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 09 August, 2000 (09.08.00), & JP 2000-295990 A	1-13
A	Osamu NOMURA et al., Genome Kinou Kenkyu, Yodosha Co., Ltd., 10 April, 2000 (10.04.00), Pages 138 to 149	1-13
A	Kai TANG et al. "Chip-based genotyping by mass spectrometry", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, August 1999, Vol.96, No.18, Pages 10016 to 10020	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
14 March, 2002 (14.03.02)

Date of mailing of the international search report  
19 March, 2002 (19.03.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10892

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	David G. WANG et al. "Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome", SCIENCE, May 1998, Vol.280, No.5366, pages 1077 to 1082	1-13

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl <sup>7</sup> C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/53, G01N27/62, G01N33/566 C12M1/00		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl <sup>7</sup> C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/53, G01N27/62, G01N33/566 C12M1/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JICSTファイル (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 96/29431 A (シークエンオム インコーポレーテッド) 1996.09.26 & JP 11-508122 A & US 5605798 A & EP 815261 A	1-13
A	EP 1026259 A (富士写真フイルム株式会社) 2000.08.09 & JP 2000-295990 A	1-13
A	野村 修 他 ゲノム機能研究, 羊土社, 2000.04.10 p.138-149	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 14.03.02	国際調査報告の発送日 19.03.02	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 新見 浩一 (印) 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Kai TANG et al. Chip-based genotyping by mass spectrometry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA August 1999, Vol. 96, No. 18, p. 10016-10020	1-13
A	David G. WANG et al. Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome. SCIENCE May 1998, Vol. 280, No. 5366, p. 1077-1082	1-13

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11)

**EP 1 350 851 A1**

(12)

**EUROPEAN PATENT APPLICATION**  
published in accordance with Art. 158(3) EPC

(43) Date of publication:

08.10.2003 Bulletin 2003/41

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **C12Q 1/68**, C12N 15/09,  
G01N 33/53, G01N 27/62,  
G01N 33/566, C12M 1/00

(21) Application number: 01271113.1

(22) Date of filing: 12.12.2001

(86) International application number:  
PCT/JP01/10892

(87) International publication number:  
WO 02/050307 (27.06.2002 Gazette 2002/26)

(84) Designated Contracting States:

AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE TR

Designated Extension States:

AL LT LV MK RO SI

(30) Priority: 12.12.2000 JP 2000378091

(71) Applicant: CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI  
KAISHA  
Tokyo, 115-8543 (JP)

(72) Inventors:

- INOKO, Hidetoshi  
Atsugi-shi, Kanagawa 243-0034 (JP)
- TAMIYA, Gen  
Isehara-shi, Kanagawa 259-1143 (JP)

- NAKAJIMA, Kenji  
Isehara-shi, Kanagawa 259-1138 (JP)
- KIMURA, Naoki  
Chiba-shi, Chiba 266-0015 (JP)
- NAGASHIMA, Renpei,  
c/o CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI K.  
Tokyo 104-8301 (JP)
- MORIKAWA, Minoru,  
c/o CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI K.  
Tokyo 104-8301 (JP)
- OKAMOTO, Kouichi  
Isehara-shi, Kanagawa 259-1132 (JP)

(74) Representative: Harding, Charles Thomas  
D. Young & Co.  
21 New Fetter Lane  
London EC4A 1DA (GB)

(54) **METHOD OF DETECTING POLYMORPHISM IN DNA BY USING MASS SPECTROSCOPY**

(57) In the detection of a genetic polymorphism using a mass spectrometer, a genomic DNA containing target polymorphism can be separated from a DNA sample and bound at the same time onto a platform by the following steps: binding an oligonucleotide that hybridizes with the genomic DNA containing the target polymorphism to the platform; and then applying the ge-

nomeric DNA sample to the platform. Thus, a target polymorphism can be more efficiently detected. According to the method of the present invention, polymorphisms in a large number of specimens can be quickly and comprehensively detected.

EP 1 350 851 A1

**Description**Technical Field

5 [0001] The present invention relates to a system for efficiently identifying polymorphisms in genome using mass spectrometry.

Background Art

10 [0002] Due to the progress in genome analysis techniques, the complete human genome sequence is now being deciphered. Furthermore, using the identified genome sequence information, differences in the genome sequence among individuals, i.e., genetic polymorphism is being actively determined. The determination of genetic polymorphism enables determination of disease related genes and disease causing genes, as well as target genes for drug development. Therefore, in recent years, determination of genetic polymorphism has become one of the most important  
15 issues in the field of medical treatment and diagnosis.

[0003] Conventionally, PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) method is used for determining genetic polymorphism. The principle of this method involves the procedure of: (1) reacting a nucleotide sequence-specific restriction enzyme to PCR amplified product; (2) subjecting the product to electrophoresis; and (3) detecting the presence or absence of cleavage due to differences in the nucleotide sequences as a difference in molecular weight.  
20 However, this method has a few drawbacks: a restriction enzyme specifically recognizing a polymorphic site does not always exist; and this method is not suited for a large number of samples since restriction enzymes to be used will differ depending on the targeted SNPs.

[0004] PCR-SSPC (Single-Strand Conformation Polymorphism) method has also been used for the detection of genetic polymorphism. When a DNA denatured to single strands is returned to nondenaturing conditions, it forms higher-order molecular structures, such as a hairpin loops. This intramolecular structure is greatly affected and altered by even a single nucleotide mutation. The PCR-SSPC method is based on the principle of detecting structural differences such as the differences in mobility in polyacrylamide gel electrophoresis under nondenaturing conditions. However, there are certain problems with this method. This method fails to detect all polymorphisms due to difficulty in detecting all such mutations and difficulty in obtaining reproducible data due to changes in the mobility because of electrophoretic conditions.  
30

[0005] Furthermore, genetic polymorphism has also been analyzed using automatic fluorescence sequencer. According to this method, first, primers are designed to sandwich a polymorphic microsatellite repeat sequence between the primers, and the primers are modified with fluorescence. Next, PCR is performed using these primers, the obtained product is electrophoresed on automatic fluorescence sequencer, and by measuring their chain lengths using a standard DNA as an indicator, polymorphism in the repeat sequence is detected. Recently, with the development of sequencers capable of processing a large number of samples, this method has become widely used, and is an effective means for detecting microsatellite polymorphisms. However, this method has certain problems. For example, the exact chain length of a sample cannot be specified and polymorphism of microsatellites with a repeat unit of 1 or 2 bases is difficult to determine via this method.  
35

[0006] On the other hand, detection of polymorphism using mass spectrometry is also being performed. Until recently, mass spectrometry had been used mainly for testing the purity of synthetic oligonucleotides and not for detecting polymorphism due to reasons such as inability to quickly analyze a large number of samples and the assumed limit of the molecular weight of DNA that can be detected with this method. Testing the purity using mass spectrometry, a synthetic oligonucleotide specimen is directly applied with a matrix solution to a stainless steel platform or to a platform maintaining equivalent conductivity, dried, and then peak detection is carried out by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).  
40

[0007] It is only recent that detection of single nucleotide polymorphism (SNP) using a mass spectrometer is being performed. According to this method, a genomic fragment to be detected is immobilized onto a platform by a silicone dioxide derivatization reaction, which is then subjected to the polymerase chain reaction using Primer-Oligo Based Extension Primers, followed by detection of the reactants using a mass spectrometer, and thereby determining the single nucleotide polymorphism (Kai Tang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 96, pp. 10016-10020, (1999)).  
45

[0008] However, when measuring a large number of specimens, these conventional methods for detecting genetic polymorphisms using a mass spectrometer require a lot of time and effort. This is because a DNA sample containing polymorphism to be detected has to be prepared and then directly applied to a platform to measure the molecular weight.  
50

Disclosure of the Invention

55 [0009] This need in the art led to the present invention, the objective of which is to provide a method that enables

efficient detection of genetic polymorphism using a mass spectrometer. Another objective of this invention is to provide a method for quickly and comprehensively detecting genetic polymorphisms in a large quantity of specimens.

[0010] The present inventors carried out extensive research to achieve the above-mentioned objectives. As a result, the present inventors discovered that genomic DNA containing target polymorphism can be separated from a DNA sample on a platform and also captured on the platform in the detection of genetic polymorphism using a mass spectrometer by binding oligonucleotides that hybridize with genomic DNA containing the target polymorphism on the platform and by applying the genomic DNA sample to this platform; which method finally enables efficient detection of the target polymorphism.

[0011] Considerable time and effort was required to detect polymorphism in previous methods because genomic DNA containing target polymorphism was separated in advance and then directly applied to a platform to detect the polymorphism. On the other hand, according to the method of the present invention, oligonucleotides that hybridize to genomic DNA containing target polymorphism are bound to a platform. Therefore, even when DNAs other than the genomic DNA containing the target polymorphism are included in a DNA sample, the target DNA can be separated and at the same time captured on the platform by a hybridization reaction. Thus, according to the method of the present invention, there is no need to separate in advance the genomic DNA containing the polymorphism before applying the DNA to the platform. As a result, efficient detection of the polymorphism can be performed. This is especially effective for detecting polymorphisms of many samples, such as, comprehensively determining the variation of genetic polymorphism of a sample group of 100 to 1000 people, identifying a genetic marker (e.g., polymorphic microsatellite) necessary for a disease correlation analysis of a certain disease group, etc.

[0012] This invention was completed based on the above-mentioned findings and provides a method for separating and capturing DNA that contains target polymorphism utilizing hybridization reaction on a platform in the detection of polymorphisms in DNA using mass spectrometry.

[0013] More specifically, the present invention provides:

(1) a method for detecting polymorphism in a DNA, which comprises the steps of:

- (a) preparing from a subject, a DNA sample containing a polymorphic site and neighboring region thereof;
- (b) hybridizing the above-mentioned DNA sample to an oligonucleotide fragment that can specifically hybridize to a DNA containing a target polymorphism, wherein said oligonucleotide fragment is immobilized on a platform; and
- (c) detecting by mass spectrometry the DNA hybridized to the oligonucleotide fragment immobilized on the platform;

(2) the method of (1), wherein the oligonucleotide fragment immobilized on the platform has a nucleotide sequence capable of specifically hybridizing to the nucleotide sequence of the neighboring region of the polymorphism to be detected;

(3) the method of (1), wherein the DNA sample of step (a) can be obtained by: (i) performing polymerase chain reaction with a genomic DNA derived from a subject as a template using a primer pair containing a specifically cleavable site in at least one of the primers, which primer pair is designed to sandwich the polymorphic site between the primers, (ii) cleaving the obtained amplified product at the specifically cleavable site, and (iii) adding an arbitrary DNA to the amplified product after the cleavage, and wherein the oligonucleotide of step (b) is an oligonucleotide specifically hybridizing to the arbitrary DNA;

(4) the method of (3), wherein the specifically cleavable site is a restriction enzyme site;

(5) the method of any one of (1) to (4), wherein the polymorphism is a microsatellite;

(6) the method of any one of (1) to (5), wherein the DNA sample containing the polymorphic site and neighboring region thereof is prepared using the polymorphic site of a plurality of different loci of the same person as the target, and the DNA sample is simultaneously hybridized to the oligonucleotide immobilized on the same platform;

(7) the method of any one of (1) to (5), wherein the DNA sample containing the polymorphic site and neighboring region thereof is prepared using the polymorphic site of the same loci of a plurality of people as the target, and the DNA sample is simultaneously hybridized to the oligonucleotide immobilized on the same platform;

(8) a platform to be used in the method of (3), which is immobilized with an oligonucleotide that specifically hybridizes to the arbitrary DNA;

(9) a platform to be used in the method of (6), which is immobilized with an oligonucleotide fragment that hybridizes to the DNA sample containing the polymorphic site and neighboring region thereof, and which sample has been prepared using as the target the polymorphic site of a plurality of different loci of the same person;

(10) a platform to be used in the method of (7), which is immobilized with an oligonucleotide fragment that hybridizes to the DNA sample containing the polymorphic site and neighboring region thereof, and which sample has been prepared using as the target the polymorphic site of the same loci of a plurality of people;

- (11) the platform of (9) or (10), wherein the oligonucleotide fragment has a sequence that specifically hybridizes to the sequence of the neighboring region of the polymorphism;  
 (12) the platform of any one of (8) to (11), wherein the polymorphism is a microsatellite; and  
 (13) the platform of any one of (8) to (12), which is a glass sheet.

**[0014]** The present invention provides a method for efficient detection of polymorphism in DNA using a mass spectrometer. In the present invention, first, a DNA sample containing a polymorphic site and neighboring region thereof is prepared from a subject (step (a)).

**[0015]** There is no particular limitation on the polymorphism that can be detected according to the method of the present invention. Examples of polymorphisms include single nucleotide polymorphisms (SNPs), microsatellites, etc; however, for correlation analysis wherein vast genomic regions are used as the target, microsatellites are especially preferable. When performing a correlation analysis that covers the entire genomic region of human utilizing microsatellites, the objective may be accomplished with the use of microsatellites from approximately 30,000 sites. However, when single nucleotide polymorphisms are used, approximately 100,000 sites are considered necessary. Therefore, when performing a correlation analysis targeting vast genomic regions employing the method of this invention, target microsatellites are preferably used because the number of polymorphisms required as the detection target can be decreased.

**[0016]** A DNA sample containing a polymorphic site and neighboring region thereof can be prepared from a subject, as follows. Specifically, first, a microsatellite repeat sequence is detected via computer from the human genome sequence and primers are set so that they sandwich the repeated sequence and the chain length of a unit of the replication sequence (amplicon) is 200 to 300 bp. Next, a DNA sample of a desired size is obtained by performing PCR with the genomic DNA of the subject as a template and using the primers set in this manner.

**[0017]** In this invention, a "neighboring region" of a polymorphic site indicates a DNA region adjacent to the 5'-side and 3'-side of the polymorphic site on the genomic DNA. The size of a DNA fragment that can be analyzed using a mass spectrometer is generally 200bp to 300 bp. Therefore, according to this invention, a "region neighboring a polymorphic site" which is the target for performing gene amplification by setting primers is usually 300 bp or less, preferably 200 bp or less from the polymorphic site.

**[0018]** Next, according to the method of this invention, an oligonucleotide fragment immobilized on a platform which fragment can specifically hybridize to a DNA containing a target polymorphism is provided; and the above-mentioned DNA sample is hybridized to the fragment (step (b)).

**[0019]** In this step, a DNA containing a target polymorphism is captured on a platform simultaneously with the separation of the DNA from the DNA sample. Therefore, compared to conventional methods wherein DNA containing a target polymorphism had been prepared in advance and then applied, in this method time and effort is markedly reduced. This is especially remarkable when detecting polymorphisms in a large quantity of specimens. According to the present invention, even when applying a DNA sample consisting of a mixture of DNAs containing a plurality of polymorphisms to a platform on which a plurality of oligonucleotides targeting each of the plurality of polymorphisms are bound as different dots, DNA corresponding to each of the oligonucleotides are separated on the platform. Therefore, depending on the position of hybridization, one can differentiate a DNA to the polymorphism it corresponds. A quick and comprehensive detection of polymorphisms in a large quantity of specimens is enabled by the present method.

**[0020]** There are no particular limitations on the "platform" to be used in the method of the present invention as long as it is a material on which oligonucleotides can be immobilized; however, it is preferably a material in the form of a sheet. Since DNAs used as the detection target is ionized, materials having electroconductivity are used as the platform to bind oligonucleotides. There are no particular limitations on the platform as long as it has electroconductivity. For example, glass sheet immobilized onto an electroconductive sheet can be preferably used as a platform in this invention. Examples of a preferable conductive sheet include a stainless steel sheet. The glass sheet is preferably coated with polycarbodiimide.

**[0021]** There are no particular limitations on the oligonucleotide to be immobilized onto a platform as long as it is an oligonucleotide fragment that can specifically hybridize to a DNA containing a target polymorphism. Herein, the phrase "specifically hybridize" means that the hybridization substantially occurs with DNAs that contain the target polymorphism in the DNA sample, and that no hybridization substantially occurs with other DNAs. The oligonucleotide preferably has a nucleotide sequence capable of specifically hybridizing to the nucleotide sequence of the neighboring region of the polymorphism to be detected. As long as specific hybridization is possible, the oligonucleotides do not necessarily have to be completely complementary to the nucleotide sequence of the neighboring region of the polymorphism to be detected.

**[0022]** The oligonucleotide to be immobilized on a platform is not limited to any one kind, and may be a mixture of multiple kinds of oligonucleotides that are complementary to the genomic fragment within the region to be identified. In a preferred embodiment of the present invention, the oligonucleotide to be immobilized on a platform can be designed



to yield genetic information from the same person. For example, oligonucleotides targeting many polymorphic sites (e. g., 10, 000 to 30,000 sites) maybe immobilized on one or multiple platforms as a single set to identify polymorphisms in a microsatellite of the same person. Simultaneous application and hybridization of a DNA sample prepared from a subject to such multiple kinds of oligonucleotides on the same platform enables quick and comprehensive detection of a plurality of polymorphisms in the same person. Consequently, diseases that the subject may develop or has developed may be readily identified by binding oligonucleotides targeting a plurality of polymorphisms relating to a plurality of diseases on a platform. Thus, such platforms are especially useful for genetic diagnosis.

[0023] Furthermore, in another preferred embodiment of the present invention, genetic information relating to a specific polymorphism in a sample group of a plurality of people can be obtained quickly and comprehensively by binding the same oligonucleotide as multiple dots on a platform. Such an embodiment is especially effective for performing disease correlation analysis using genetic polymorphisms (for example, microsatellites and SNPs).

[0024] When an arbitrary DNA is added to the terminus of a DNA containing a polymorphism and neighboring region thereof during the preparation of a DNA sample from a subject, the polymorphism of a target DNA can be detected using a platform immobilized with oligonucleotides that specifically hybridize to the arbitrary DNA. In this case, the DNA sample can be obtained by: (i) performing PCR with genomic DNA derived from the subject as the template using a primer pair which contains a specific cleavable site in at least one of the primers and which primer pair is designed to sandwich the polymorphic site between the primers; (ii) cleaving the obtained amplified product at the specific cleavable site; and (iii) adding an arbitrary DNA to the amplified product after the cleavage. The specific cleavable site in the DNA sample is preferably a restriction enzyme site. Preferable restriction enzyme sites are those that are present only in low frequency in the genome, such as, the NotI site. There are no particular limitations on the arbitrary DNA added to the amplification product after the cleavage treatment, and for example, polyA sequence may be preferably used.

[0025] The length of an oligonucleotide that is bound to a platform is generally 5 to 200 bases, preferably 10 to 130 bases, and more preferably 15 to 100 bases. Immobilization of the oligonucleotides to the substrate platform can be performed chemically or non-chemically. An example of a chemical immobilization method is the carbodiimide method (Unexamined Published Japanese Patent Application No. (JP-A) 2000-146978), while an example for a non-chemical immobilization method is the polylysine method (P. O. Brown's Lab.: <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/>).

[0026] The hybridization reaction between an oligonucleotide on the platform and a DNA sample can be performed under conditions described in the Examples. However, it is well known to those skilled in the art that the hybridization conditions may vary depending on factors, such as the length of the oligonucleotide.

[0027] Next, in the method of this invention, the DNA hybridized to the oligonucleotide fragment immobilized on the platform is detected by mass spectrometry (step (c)).

[0028] There are no limitations on the method of mass spectrometry as long as the absolute molecular weight can be determined; for example, MALDI-TOF MS is preferred. Samples for MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) are prepared as homogeneous mixtures with large amounts of matrix. The matrix absorbs nitrogen laser beam, ultraviolet light (wavelength=337 nm) and converts light to thermal energy. At this time, a small portion of the matrix is rapidly heated and is vaporized with the sample. Time of Flight Mass Spectrometry (TOF MS) is a method for mass spectrometry utilizing the difference in the flight time of ions due to difference in the mass-to-charge ratio  $m/z$ , wherein  $z$  denotes ionic charge and  $m$  denotes ionic mass. In contrast to other mass spectrometric methods, such as GPC and LALLS, wherein relative molecular weights are determined, MALDI-TOF is characterized by its ability to yield absolute molecular weights.

[0029] A DNA sample to be detected by MALDI-TOF MS does not necessarily require high-temperature treatment (such as at 90°C), or rapid cooling treatment of the non-chemically bonded double strand as pretreatments. However, these pretreatments are preferable for elevating specimen sensitivity. When performing mass spectrometry, an appropriate matrix solution is added to the platform hybridized with DNA in order to dry and immobilize the DNA on the platform.

[0030] In mass spectrometry, the flight time of an ionized specimen (DNA hybridized to an oligonucleotide on the platform) differs depending on its molecular weight, and different flight times are detected as different peak positions. The higher the molecular weight of the specimen, the shorter the flight time will be, and conversely, the smaller the molecular weight, the longer the flight time. Therefore, the molecular weight of a specimen can be determined from the position of the detected peak, and as a result, the polymorphism in the specimen (number of microsatellite repeats and the type of nucleotide in a single nucleotide polymorphism) can be identified.

#### Brief Description of the Drawings

[0031]

Fig. 1 shows the result of a MALDI-TOF MS measurement of 200 bp dsDNA (PCR product) using a glass sheet.

Fig. 2 shows the hybridization signal when the oligonucleotide of SEQ ID NO: 1 was immobilized using a stainless steel sheet as the platform.

Fig. 3 shows the hybridization signal when the oligonucleotide of SEQ ID NO: 2 was immobilized using a stainless steel sheet as the platform.

Fig. 4 shows the immobilization of a cover glass to a sample slide made from a stainless steel sheet.

Fig. 5 shows the hybridization signal when the oligonucleotide of SEQ ID NO: 4 or 5 (negative control) was immobilized using a glass sheet as the platform.

#### Best Mode for Carrying out the Invention

**[0032]** The present invention is specifically illustrated below with reference to Examples, but it is not to be construed as being limited thereto.

[Example 1] MALDI-TOF MS measurement of 200 bp dsDNA (PCR product) using glass sheet

(1) PCR reaction

**[0033]** The reaction mixture solution (x 1) used for the PCR was as follows (the amounts for x100 are shown in parentheses).

Template DNA 10 ng (pBluescript II SK(+)) plasmid DNA)	1.0 $\mu$ L (100 $\mu$ L)
dH <sub>2</sub> O	13.4 $\mu$ L (1340.0 $\mu$ L)
10x PCR Reaction Buffer (Applied Biosystems)	2.0 $\mu$ L (200.0 $\mu$ L)
dNTP (2.0 mM each) (Applied Biosystems)	2.5 $\mu$ L (250.0 $\mu$ L)
Forward and Reverse Primers Mix (20 $\mu$ M each)	1.0 $\mu$ L (100.0 $\mu$ L)
AmpliTaqGold (Applied Biosystems)	0.1 $\mu$ L (10.0 $\mu$ L)
Total Volume	20.0 $\mu$ L (2000.0 $\mu$ L)

**[0034]** Using a Thermalcycler Cycle PE9700 (Applied Biosystems), PCR was performed under a condition of "95°C for 9 min"; 40 cycles of "96°C for 45 sec, 60°C for 45 sec, 72°C for 1 min"; and then "72°C for 5 min, and termination at 4°C".

(2) Purification by MinElute PCR Purification kit

**[0035]** The obtained PCR product was purified according to the instruction of QIAGEN MinElute PCR Purification kit. Three-hundred  $\mu$ L of the PCR product per column was passed through the column and eluted with 10  $\mu$ L of dH<sub>2</sub>O.

(3) Ethanol precipitation

**[0036]** Ethanol precipitation was carried out by adding 46.9  $\mu$ L of 10 M ammonium acetate, 750.0  $\mu$ L of 100% ethanol, and 0.5  $\mu$ L of glycogen to 300  $\mu$ L of the above-mentioned QIAGEN purified product (6 sets (60  $\mu$ L) + dH<sub>2</sub>O 240  $\mu$ L). The mixture was left standing at -20°C for 20 min, centrifuged at 12,000 rpm for 15 min, the obtained precipitate was rinsed with 70% ethanol followed by further centrifugation at 12,000 rpm for 15 min, dried for 10 min, and finally eluted with 15  $\mu$ L of dH<sub>2</sub>O.

(4) Quantitative determination using PicoGreen dsDNA Quantitation kit

**[0037]** Quantitative determination was carried out according to the instruction of PicoGreen dsDNA Quantitation kit (Molecular Probes).

(5) Mixing with matrix

**[0038]** A glass slide (Code. #000: 0.04 mm thick) was immobilized to a stainless steel sheet (sample slide) with a double-sided adhesive tape.

**[0039]** Furthermore, a matrix was prepared by dissolving 0.0974 g of 0.7 M 3-hydroxypyridine-2-carboxylic acid (3-hydroxy-2-picolinic acid) (MW 139.11) and 0.010583 g of 0.07 M diammonium hydrogen citrate (MW 226.2) in 1 ml of 50% acetonitrile.

[0040] The matrix and sample were mixed in a 1:1 ratio, and 0.5  $\mu$ L thereof was spotted onto the glass. The sample slide was spontaneously dried (crystallized), introduced into a mass spectrometer for measurement.

#### (6) MALDI-TOF mass spectrometry

[0041] Measurement was conducted using KRATOS KOMPACT MALDI 4 (Shimadzu). The measurement conditions for KOMPACT MALDI 4 are shown below.

Flight path (ion flight path)	Linear
Polarity (ion polarity)	Negative
Mass (ion acceleration voltage)	20 kV
Profiles (number of measurements per ion sample)	50
Aim (full range sample irradiation: 1-1000)	1-1000
Power (laser power)	140-170 (when measuring 200 bp)
Accumulate	10
Average	1

[0042] Because of the measurement, a peak showing remarkably high resolution was obtained for a DNA molecule having a high molecular weight, i.e., 200 bp (Fig. 1). This shows that a glass sheet, which is an insulator and had been considered inappropriate for the use in mass spectrometry, is adequately applicable for mass spectrometry. At the same time, the result suggests that a DNA sample hybridized on a glass sheet can be directly subjected to mass spectrometry in that state.

#### [Example 2] Mass spectrometry of DNA molecule hybridized on a stainless steel sheet

##### (1) Immobilization of nucleic acids

[0043] A stainless steel sheet (stainless steel sheet; manufactured by KRATOS ANALYTICAL Corp.) was carbodiimidated according to the method of JP-A 2000-146978.

[0044] Oligonucleotides having the nucleotide sequences shown in SEQ ID NO: 1 (calculated value; MW 7583) and SEQ ID NO: 2 (calculated value; MW 7638), respectively, were dissolved in a buffer to a concentration of 100 pmol/ $\mu$ L to produce DNA solutions. Using a Pipetman, 1  $\mu$ L each of the above DNA solutions was spotted to a designated position on the carbodiimidated stainless steel sheet.

[0045] Next, the sheet was dried at 37°C for 30 min, soaked in buffer A (0.2 M sodium chloride, 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.05% Triton X-100) containing 3% BSA (bovine serum albumin), and dried at 37°C for 15 min. Then, this carbodiimidated stainless steel sheet was washed with TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.2)/1 mM EDTA), and dried at 37°C for 15 min.

##### (2) Hybridization

[0046] Twenty-five  $\mu$ L of hybridization solution [5x SSC (SSC: 1.5 M NaCl, 0.15 M sodium citrate), 10% dextran, the probe of SEQ ID NO: 3 (calculated value; MW 6190)] was placed on the above-mentioned carbodiimidated stainless steel sheet at the part immobilized with the DNA, and the sheet was heated overnight using a 40°C water bath.

##### (3) Post-hybridization

[0047] After hybridization, the hybridization solution was lightly absorbed from the carbodiimidated stainless steel sheet, post-hybridization washing was carried out, and non-specifically adsorbed probes were removed.

[0048] Conditions for the post-hybridization washing were: (i) 2x SSC, 0.1% SDS, at room temperature for 5 min, twice; (ii) 0.2x SSC, 0.1% SDS, at 40°C for 5 min, twice; (iii) 2x SSC, at room temperature for 5 min; and (iv) 0.3 M aqueous ammonium citrate solution, at room temperature for 15 sec.

##### (4) Detection of hybridization

[0049] The carbodiimidated stainless steel sheet thus obtained was measured using KOMPACT MALDI 2 (Shimadzu Corp.). The results are shown in Fig. 2 and Fig. 3.

[0050] According to the results presented in Fig. 2 and Fig. 3, the method for detecting nucleic acids of the present

invention was revealed to allow specific detection of the probe nucleic acid (observed value; at the position of MW 6185) as an extremely clear signal. On the other hand, no signal was detected from the spot of SEQ ID NO: 2.

[Example 3] Mass spectrometry of DNA molecules hybridized on cover glass

(1) Immobilization of nucleic acids (Fig. 4)

[0051] Cover glass #000 (Matsunami Glass Corp.) was carbodiimidated according to the method of JP-A 2000-146978.

[0052] Oligonucleotides having the nucleotide sequences indicated in SEQ ID NO: 4 (Capture oligomer) and SEQ ID NO: 5 (negative control), respectively, were dissolved in buffer to a concentration of 120 pmol/ $\mu$ L to yield DNA solutions. Using a Pipetteman, 0.5  $\mu$ L each of the aforementioned DNA solutions and buffer were spotted onto the designated position on the carbodiimidated cover glass.

[0053] Next, immobilization procedure was carried out, the glass was soaked in buffer A (0.2 M sodium chloride, 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.05% Triton X-100) containing 3% BSA (bovine serum albumin), and dried at 37°C for 15 min. Then, this carbodiimidated cover glass was washed with TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.2)/1 mM EDTA), and dried at 37°C for 15 min. The buffer without the addition of oligonucleotide (DNA(-)) was used as the control.

(2) Hybridization

[0054] Ten  $\mu$ L of hybridization solution [5x SSC (SSC: 1.5 M NaCl, 0.15 M sodium citrate), 10% dextran, the probe of SEQ ID NO: 6 or SEQ ID NO: 7] was placed on the above-mentioned carbodiimidated cover glass at the part immobilized with the DNA, and the glass was heated overnight in a 30°C dryer.

(3) Post-hybridization

[0055] After hybridization, the hybridization solution was lightly absorbed from the carbodiimidated cover glass, and post-hybridization washing was carried out under following condition.

[0056] The condition for post-hybridization washing was: (i) 2x SSC, at room temperature for 5 min; and (ii) 0.3 M aqueous ammonium citrate solution, at room temperature for 15 sec.

(4) Detection of hybridization

[0057] The obtained carbodiimidated glass sheet was measured using "KOMPACT MALDI 4 (Shimadzu Corp.)". The results of mass spectrometry are shown in Fig. 5. From samples containing complementary sequences, peaks were observed. Therefore, samples hybridized on a glass sheet were also found to be measurable by MALDI-TOF MS.

[0058] The matrix for the measurements was prepared by dissolving 0.0974 g of 0.7 M 3-hydroxypyridine-2-carboxylic acid (3-hydroxy-2-picolinic acid) (MW 139.11) and 0.010583 g of 0.07 M diammonium hydrogen citrate (MW 226.2) in 1 mL of 50% acetonitrile.

[0059] Furthermore, the measurement conditions for KOMPACT MALDI 4 are shown below.

Flight path (ion flight path)	Linear
Polarity (ion polarity)	Negative
Mass (ion acceleration voltage)	20 kV
Profiles (number of measurements per ion sample)	50
Aim (full range sample irradiation: 1-1000)	1-1000
Power (laser power)	150 (50 mer), 180 (100 mer)
Accumulate	10
Average	1
Store profile	never

#### Industrial Applicability

[0060] The present invention provides a method for efficiently detecting genetic polymorphisms using a mass spectrometer. This method enables quick and comprehensive detection of genetic polymorphisms in a large number of specimens. The method of the present invention may greatly contribute towards disease correlation analysis and ge-

netic diagnosis for determining polymorphisms that cause a specific disease.

5

SEQUENCE LISTING

10

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> METHOD OF DETECTING POLYMORPHISMS IN DNA USING MASS SPECTROMETRY

15

<130> C1-A0017P

<140>

<141>

20

<150> JP 2000-378091

<151> 2000-12-12

25

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

30

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

35

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized DNA sequence

<400> 1

45

cctagagatt cctccgtatt agttc

25

50

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

55

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized DNA sequence

<400> 2

tccctgtgga tgtcaagaat ctttt

25

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized DNA sequence

<400> 3

aatacggagg aatctctagg

20

<210> 4

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized DNA sequence

<400> 4

tttttttttt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

40

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized DNA sequence

<400> 5

tttttttttt cctagagatt cctccgtatt agttc

35

<210> 6

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized DNA sequence

<400> 6

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt

50

<210> 7

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized DNA sequence

<400> 7

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 60

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt

100

# Claims

1. A method for detecting polymorphism in a DNA, which comprises the steps of:

(a) preparing from a subject, a DNA sample containing a polymorphic site and neighboring region thereof;  
 (b) hybridizing the above-mentioned DNA sample to an oligonucleotide fragment that can specifically hybridize to a DNA containing a target polymorphism, wherein said oligonucleotide fragment is immobilized on a platform; and  
 (c) detecting by mass spectrometry the DNA hybridized to the oligonucleotide fragment immobilized on the platform.

2. The method of claim 1, wherein the oligonucleotide fragment immobilized on the platform has a nucleotide sequence capable of specifically hybridizing to the nucleotide sequence of the neighboring region of the polymorphism to be detected.
3. The method of claim 1, wherein the DNA sample of step (a) can be obtained by: (i) performing polymerase chain reaction with a genomic DNA derived from a subject as a template using a primer pair containing a specifically cleavable site in at least one of the primers, which primer pair is designed to sandwich the polymorphic site between the primers, (ii) cleaving the obtained amplified product at the specifically cleavable site, and (iii) adding an arbitrary DNA to the amplified product after the cleavage, and wherein the oligonucleotide of step (b) is an oligonucleotide specifically hybridizing to the arbitrary DNA.
4. The method of claim 3, wherein the specifically cleavable site is a restriction enzyme site.
5. The method of any one of claims 1 to 4, wherein the polymorphism is a microsatellite.
6. The method of any one of claims 1 to 5, wherein the DNA sample containing the polymorphic site and neighboring region thereof is prepared using the polymorphic site of a plurality of different loci of the same person as the target, and the DNA sample is simultaneously hybridized to the oligonucleotide immobilized on the same platform.
7. The method of any one of claims 1 to 5, wherein the DNA sample containing the polymorphic site and neighboring region thereof is prepared using the polymorphic site of the same loci of a plurality of people as the target, and the DNA sample is simultaneously hybridized to the oligonucleotide immobilized on the same platform.
8. A platform to be used in the method of claim 3, which is immobilized with an oligonucleotide that specifically hybridizes to the arbitrary DNA.
9. A platform to be used in the method of claim 6, which is immobilized with an oligonucleotide fragment that hybridizes to the DNA sample containing the polymorphic site and neighboring region thereof, and which sample has been prepared using as the target the polymorphic site of a plurality of different loci of the same person.
10. A platform to be used in the method of claim 7, which is immobilized with an oligonucleotide fragment that hybridizes to the DNA sample containing the polymorphic site and neighboring region thereof, and which sample has been prepared using as the target the polymorphic site of the same loci of a plurality of people.
11. The platform of claim 9 or 10, wherein the oligonucleotide fragment has a sequence that specifically hybridizes to the sequence of the neighboring region of the polymorphism.
12. The platform of any one of claims 8 to 11, wherein the polymorphism is a microsatellite.
13. The platform of any one of claims 8 to 12, which is a glass sheet.



Fig. 1

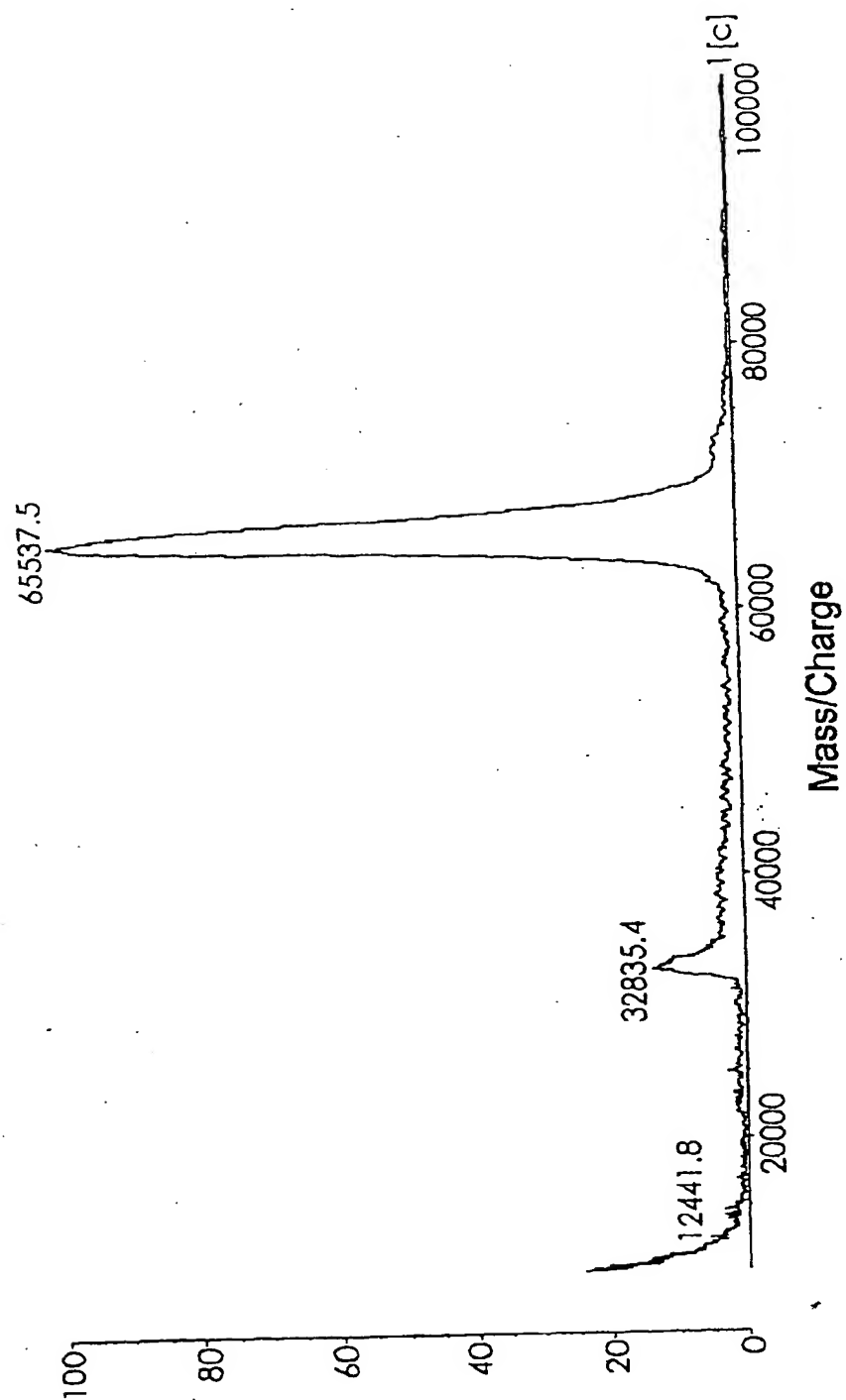


Fig. 2

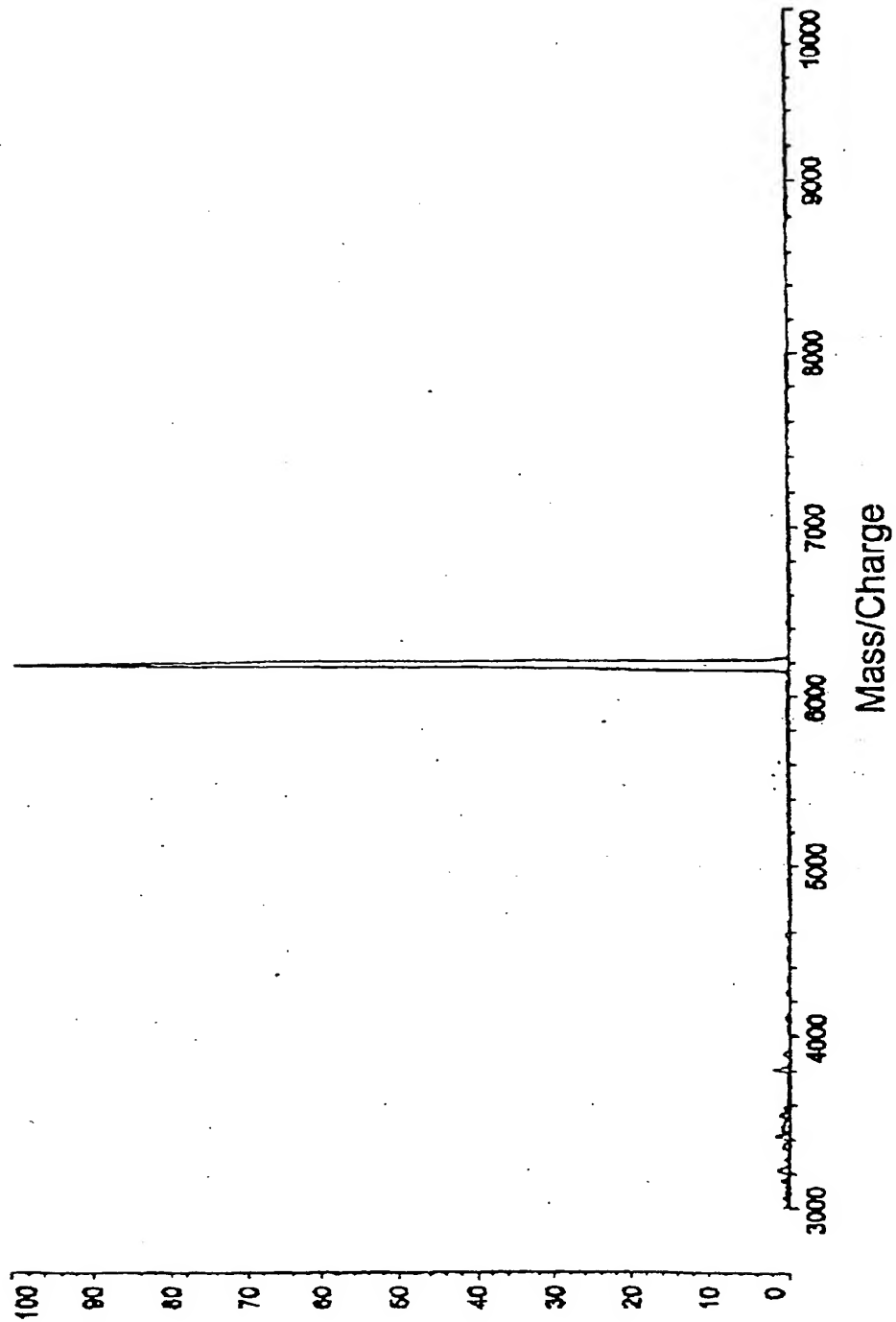


Fig. 3

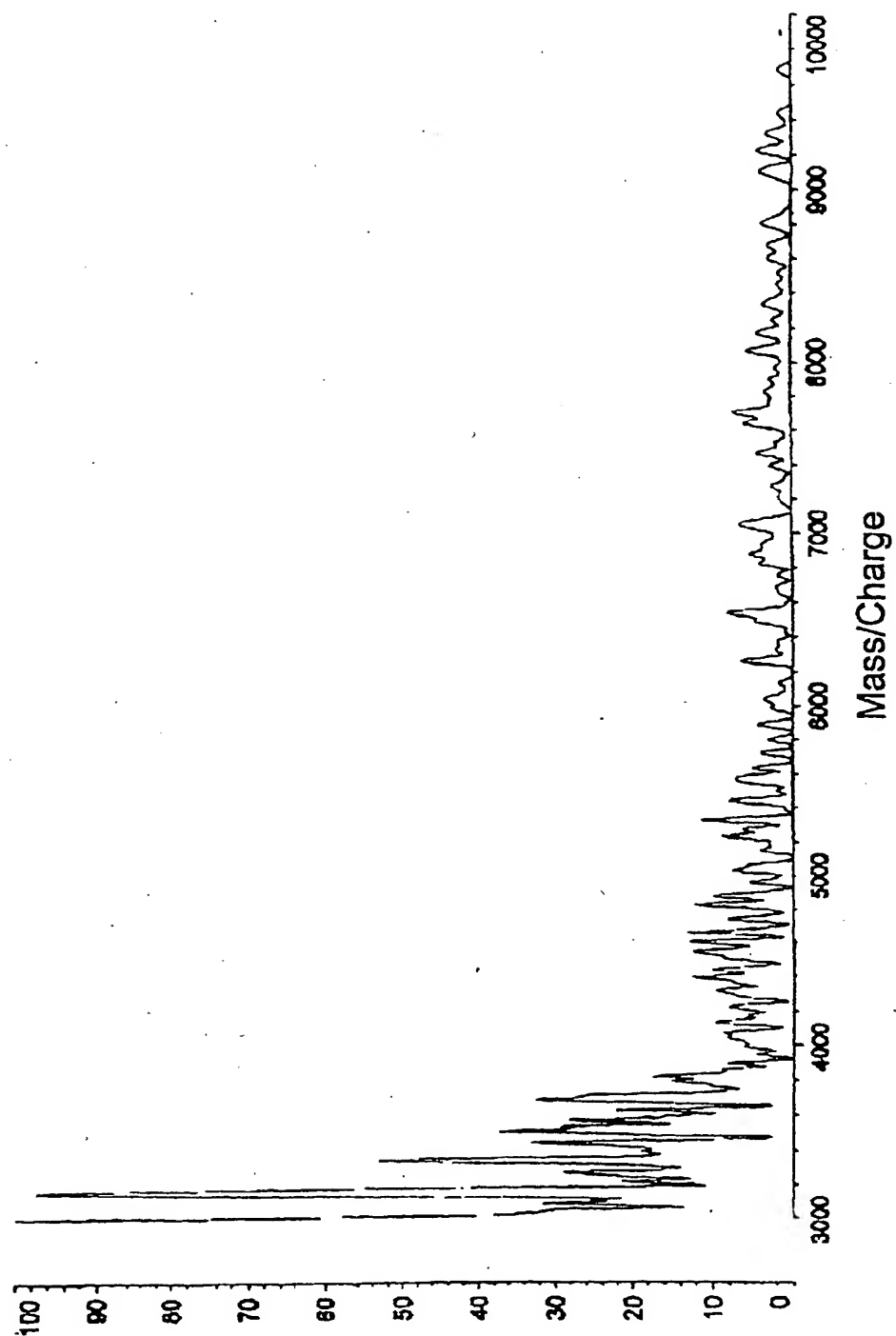


Fig. 4

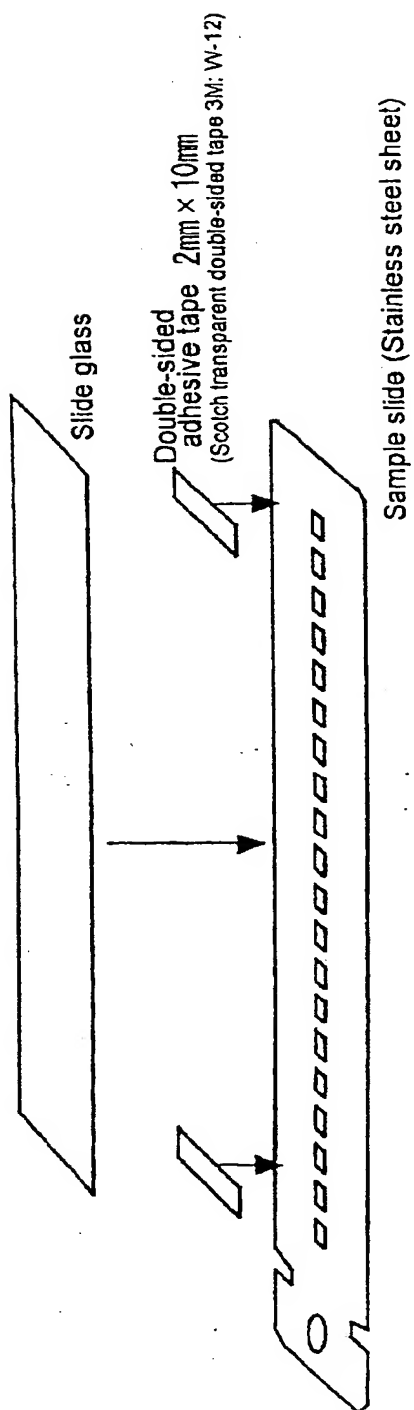
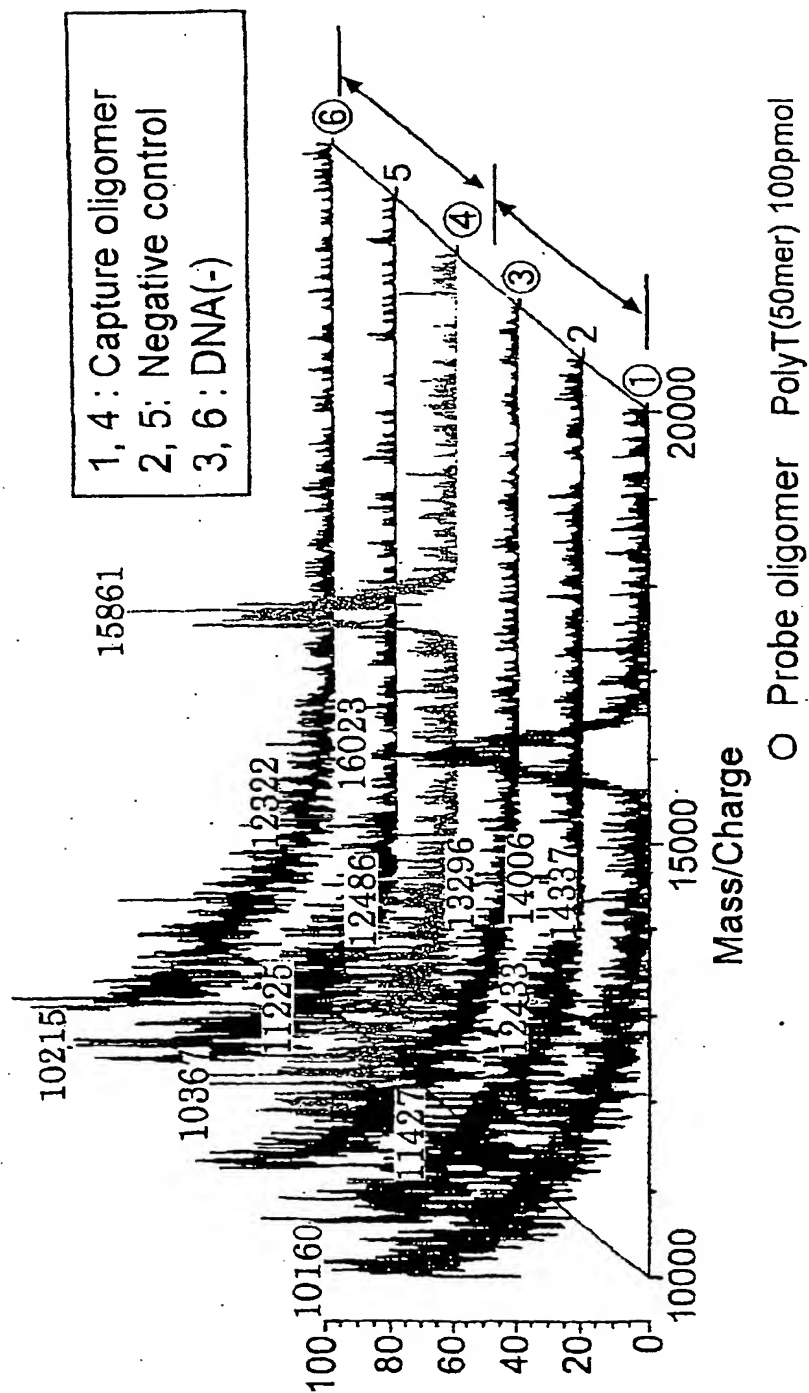


Fig. 5

Kratos Kompact MALDI 4 V5.2.4  
%Int. 100%= 0 mV 0 mV 0 mV 0 mV 0 mV 0 mV 0 mV 0 mV  
Laser power 150



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10892

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/53, G01N27/62, G01N33/566, C12M1/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/53, G01N27/62, G01N33/566, C12M1/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JICST FILE (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 96/29431, A (Sequenom Inc.), 26 September, 1996 (26.09.96), & JP 11-508122 A & US 5605798 A & EP 815261 A	1-13
A	EP, 1026259, A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 09 August, 2000 (09.08.00), & JP 2000-295990 A	1-13
A	Osamu NOMURA et al., Genome Kinou Kenkyu, Yodosha Co., Ltd., 10 April, 2000 (10.04.00), Pages 138 to 149	1-13
A	Kai TANG et al. "Chip-based genotyping by mass spectrometry", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, August 1999, Vol.96, No.18, Pages 10016 to 10020	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 March, 2002 (14.03.02)		Date of mailing of the international search report 19 March, 2002 (19.03.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10892

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	David G. WANG et al. "Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome", SCIENCE, May 1998, Vol.280, No.5366, pages 1077 to 1082	1-13

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**